

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

L'hyaluronidase hyal-2 dans deux types de cellules cancéreuses humaines

André, Bénédicte

Award date:
2006

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

L'HYALURONIDASE HYAL-2 DANS DEUX TYPES DE CELLULES CANCEREUSES HUMAINES

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Bénédicte ANDRE

Juin 2006

L'hyaluronidase HYAL-2 dans deux types de cellules cancéreuses humaines

ANDRE Bénédicté

Résumé:

HYAL-2 est une enzyme de la famille des hyaluronidases, ancrée en membrane qui dégraderait l'acide hyaluronique en fragments de 20 kDa. Cette protéine est sur-exprimée dans certaines lignées de cellules cancéreuses et semble impliquée dans les processus cellulaires fondamentaux. Par ailleurs, de nombreuses études ont montré que l'acide hyaluronique est impliqué dans les processus cancéreux. L'objectif de ce mémoire était d'étudier ses effets sur trois propriétés cellulaires dans deux types de cellules cancéreuses exprimant HYAL-2, les HCT-15, des cellules de cancer du colon et les MDA-MB231, des cellules de cancer du sein. Pour étudier l'influence qu'HYAL-2 pourrait avoir sur ces propriétés, les cellules ont été transfectées avec des siRNA dirigés contre *HYAL-2*. Après avoir mis au point les conditions de transfection, la prolifération, la motilité et l'apoptose ont été étudiées. Pour les HCT-15, HYAL-2 favorise l'apoptose et pour les MDA-MB231, elle inhibe la prolifération et la motilité. Dans ces deux types cellulaires, HYAL-2 semble donc agir comme un suppresseur de tumeurs. Afin de mieux évaluer l'influence d'HYAL-2 sur la malignité des tumeurs, d'autres propriétés cellulaires peuvent être étudiées, comme le pouvoir invasif, la sénescence ou l'inhibition de contact.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2006

Promoteur: B. Flamion

Copromoteur: J. Mertens-Strijthagen

Par ces quelques mots, je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont encouragée durant ces six mois et qui m'ont apporté leur aide pour la réalisation de ce mémoire.

Je tiens particulièrement à remercier M. Flamion, promoteur de ce mémoire, de m'avoir accueillie au sein du laboratoire de Physiologie et Pharmacologie et de m'avoir consacré de son temps, je lui en suis très reconnaissante.

Un grand merci à Mme Mertens, co-promotrice, pour ses nombreux conseils et ses remarques pertinentes.

Merci à Laurence d'avoir partagé son expérience, de m'avoir suivi tout au long de ces 6 mois ainsi que pour ses innombrables suggestions qui ont permis l'aboutissement de ce travail.

Merci à Cécile pour son aide précieuse lors des expériences d'immunofluorescence et pour sa patience au microscope confocal.

Merci à Sophie, à Mme Daelman, à Guy et Philippe pour leur disponibilité, leur soutien et l'attention qu'ils ont portés à ce travail.

Un grand merci à toutes ces personnes pour l'ambiance chaleureuse du laboratoire qui m'a permis de découvrir le travail de laboratoire et le monde de la recherche avec beaucoup de plaisir.

Je tiens à remercier Cécile, Mme Borlon, Mme Gustin et M. De Backer qui ont pris le temps de s'intéresser à ce travail.

Je voudrais terminer en remerciant les membres de ma famille et mes amis pour leur écoute ainsi que mes co-koteuses pour leurs encouragements. Merci à Arnaud pour sa patience et son soutien.

Table des abréviations

°C	Degré Celcius
Ac	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxribonucléique complémentaire
Anti-IgG	Anti-immunoglobuline G
ARNm	Acide ribonucléique messenger
Bcl-2	B-cell leukemia/lymphoma-2
bp	Paires de bases
BSA	Bovine serum albumine
cpm	Coups par minute
CPT	Camptothécine
CS	Chondroïtine-sulfate
CTL	Contrôle
DMEM	Dubelcco's modified Eagle's medium
DNase	Désoxyribonucléase
dNTP	Déoxyribonucléoside triphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
enJSRV	Bétarétrovirus endogène
env	Protéine de l'enveloppe virale (de JSRV)
ERV _s	Rétrovirus endogènes
FBS	Fœtal Bovine Serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate conjugate
GAPDH	Glycéraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase
GAG	Glycosaminoglycane
GF	Facteurs de croissance
GFP	Green Fluorescent Protein
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HA	Acide hyaluronique
HAS	Hyaluronane synthase
HYAL-1,-2,...	Hyaluronidase-1, -2,...
HYAL-P1	Hyaluronidase pseudogène 1
JSRV	Jaagsiekte Rétrovirus
kDa	Kilo Dalton
M	Molaire
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEC	Matrice extracellulaire
MSP	Protéine Stimulant les Macrophages
PAF	Paraformaldéhyde
PARP	Poly-ADP-Ribose Polymerase
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pi3K	Phosphoinositide3-kinase
Pi3k	Phosphoinositide 3,4,5-triphosphate
PM	Poids Moléculaire
RF	RNase Free
RISC	RNA-induced silencing complex
RNAi	RNA interference

RNase	Ribonucléase
ROS	Reactive oxygen species
rpm	Rotations par minute
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
RTK	Récepteur Tyrosine Kinase
siRNA	Small interferent RNA
SPAM-1	Sperm Adhesion Molecule 1
TAE	Tris-acetate EDTA
t-BHP	Tert-butyl hydroperoxyde
TCA	Trichloroacetic acid
TE	Tris-EDTA
Tm	Température de melting
TNF	Tumor Necrosis Factor
TSG	Gène suppresseur de tumeurs
TUNEL	TdT-mediated dUTP Nick End Labeling
UDP-GlcA	Acide uridine diphospho-glucuronique
UDP-GlcNAc	Uridine diphospho-N-acétylglucosamine
UV	Rayons UltraViolet
WOX1	WW domain-containing oxidoreductase

1. Introduction

1.1. L'acide hyaluronique

1.1.1. Structure et localisation

En 1934, Meyer et ses collègues isolent une nouvelle glycosaminoglycane (GAG) de poids moléculaire (PM) élevé dans l'humeur vitrée de l'œil et montrent qu'elle est composée d'un acide hexuronique et d'un sucre aminé, la glycosamine (Meyer and Palmer, 1934). Suite à leur découverte, ils décident de la nommer acide hyaluronique (HA), nom dérivant d'"acide uronique" et d'"hyaloïde" signifiant transparent en grec. L'HA est aussi appelé hyaluronane. La fonction biologique de l'HA a longtemps été une énigme et beaucoup de chercheurs l'ont considéré comme une molécule sans importance remplissant l'espace intercellulaire. Cependant, l'intérêt pour l'HA s'est intensifié, il y a environ vingt ans, après la découverte de récepteurs sur les cellules et d'une signalisation intracellulaire consécutive à leur activation (Laurent and Fraser, 1992). Par la suite, l'HA a été étudié comme agent thérapeutique potentiel et, surtout, plusieurs équipes ont montré l'existence d'une corrélation entre les niveaux de production et/ou de dégradation d'HA et la malignité de plusieurs types de cancers (Toole, 2002 ; Boregowda *et al.*, 2006 ; Delpech *et al.*, 1997).

L'HA est abondamment présent dans l'humeur vitrée de l'œil, la gelée de Wharton et la zone médullaire interne du rein (Fraser *et al.*, 1997). Il est également produit par certaines bactéries, où il est situé dans la capsule, et par certains virus mais est apparemment absent chez les invertébrés métazoaires (Toole, 2002).

L'HA est un composant ubiquiste des tissus conjonctifs et de la matrice extracellulaire (MEC) des embryons et des adultes vertébrés. Suite à sa synthèse par les HA-synthases (HAS) au niveau de la face interne de la membrane plasmique, l'HA est directement extrudé à la surface cellulaire (Spicer and McDonald, 1998 (b)) où il est retenu par liaison aux synthases ou par interaction avec des récepteurs tels que CD44 et RHAMM. De là, il peut être libéré dans les matrices péricellulaire et extracellulaire. De plus, des chaînes intactes d'HA ainsi que certains de ses récepteurs ont été détectés dans le cytoplasme, le noyau et même le nucléole (Stern, 2004), particulièrement durant les phases de croissance et de division.

L'HA est une GAG anionique et linéaire composée d'une répétition de disaccharides formés d'un acide glucuronique et d'une N-acétylglucosamine, reliés en alternance par des liens $\beta(1-4)$ et $\beta(1-3)$ (Weissmann and Meyer, 1954) (Figure 1.1). Il contient habituellement entre 2.000 et 25.000 disaccharides et son PM varie entre 10^5 et 10^7 Da (Dalton) en fonction du tissu, mais il peut également être détecté sous forme de fragments et d'oligosaccharides. Etant donné qu'à pH physiologique, le pK des groupements carboxyles de l'acide glucuronique varie de 3 à 4, l'HA est souvent porteur de charges négatives. Ces charges sont contre-balançées par des cations mobiles tels que Na^+ , K^+ , Ca^{++} et Mg^{++} (Scott, 1998). Parmi les différentes GAG dont la chondroïtine, le dermatan et l'héparan, l'HA est le plus simple, le seul non sulfaté et le seul qui ne soit pas lié de manière covalente à une structure protéique (Fraser *et al.*, 1997).

La molécule d'HA est très stable. Tout d'abord, la configuration β des deux sucres permet aux groupements hydroxyle et carboxyle d'adopter une position équatoriale stériquement favorable alors que les atomes d'hydrogène prennent une position axiale. La structure du disaccharide est donc énergiquement très stable. Ensuite, les atomes d'hydrogène forment une face non-polaire et relativement hydrophobe alors que les chaînes équatoriales constituent une face plus polaire et hydrophile (Hascall and Laurent, 1997). Par conséquent, en solution physiologique, l'HA adopte une structure hélicoïdale stabilisée par des ponts hydrogènes (Laurent and Fraser, 1992) qui occupe un grand volume (Weissman and Meyer, 1954 ; Hascall and Laurent, 1997). Cette hélice remplissant l'espace et capturant l'eau crée une matrice appropriée pour les activités cellulaires telles que la prolifération, la migration et l'infiltration (ces éléments seront détaillés plus loin).

Les molécules d'HA peuvent se lier par interactions hydrophobes et par liens hydrogènes et former des réseaux qui, notamment, confèrent des propriétés viscoélastiques à l'environnement des agrégats, propriétés utiles au niveau des articulations. L'HA interagit de la même manière avec d'autres GAG anioniques comme, par exemple, la chondroïtine sulfate dans l'humeur vitrée de l'œil, ce qui stabilise les enchevêtrements d'HA, de chondroïtine sulfate et de collagène (Scott, 1998). L'HA se lie également à ses récepteurs par des interactions qui ne sont pas encore élucidées.

1.1.2. Fonctions

Malgré la monotonie de sa composition sans branchement ni variation de la constitution en sucre, l'HA est impliqué dans un grand nombre d'activités biologiques qui varient en fonction de son PM. Une telle diversité résulte de sa capacité de s'associer à lui-même, à des récepteurs à la surface cellulaire, à des protéines ou à d'autres GAG (Stern, 2004 (a)).

Ainsi, en plus de ses fonctions d'hydratation et de ses rôles structuraux, l'HA est impliqué dans la motilité, la prolifération et la différenciation cellulaires (Boregowda *et al.*, 2006), processus notamment indispensables à la morphogenèse, à la cicatrisation de blessures ainsi qu'au développement tumoral. Grâce à sa capacité de capturer de larges quantités d'eau au sein même de sa structure, l'HA crée des matrices fluides et malléables, dans lesquelles les cellules peuvent changer de forme lors de la mitose ou pénétrer les tissus lors de la migration. L'extrusion d'HA à la surface cellulaire lors de la mitose pourrait créer un micro-environnement hydraté autour des cellules qui favorise leur détachement après la division. Les activités des HAS fluctuent avec le cycle cellulaire : la synthèse d'HA est maximale lors de la mitose et son inhibition conduit à un arrêt du cycle cellulaire (Laurent and Fraser, 1992 ; Toole, 2002).

A concentration physiologique, les molécules d'HA de haut PM s'enchevêtrent et forment un réseau aléatoire qui interagit avec d'autres composants macromoléculaires extracellulaires. Leurs interactions sont cruciales pour l'assemblage, l'intégrité structurale et les propriétés physiologiques des matrices extracellulaire et péricellulaire. Ce réseau exclut les macromolécules ne pouvant trouver d'espace dans la maille et retarde leur diffusion. Par leurs propriétés, l'HA et les autres polysaccharides régulent la distribution et le transport de protéines dans les tissus (Laurent and Fraser, 1992). Les polymères d'HA de haut PM protègent les cellules contre certains effets des fragments d'HA, empêchent les interactions cellule-cellule et inhibent les réponses aux stress ainsi que les cascades de signalisation

(Stern, 2004 (b)). Cet HA de haut PM possède également des effets anti-angiogéniques, anti-inflammatoires et immunosuppresseurs (Stern, 2003).

En revanche, les fragments résultant de la digestion de l'HA de haut PM par certaines hyaluronidases, ou bien produits d'une autre façon, ont des effets très différents de la molécule-mère. Ainsi, les fragments de moins de 20 kDa sont angiogéniques, pro-inflammatoires (ils stimulent notamment la synthèse de cytokines) et immuno-stimulateurs. Les fragments de 6 à 20 kDa sont des activateurs potentiels des cellules dendritiques, présentatrices d'antigènes (Stern, 2003). Les oligosaccharides d'une taille de 3 à 10 disaccharides inhibent la croissance de cellules tumorales indépendante de l'ancrage. Les tétrasaccharides, quand ils sont ajoutés à la culture, induisent l'expression de "heat shock proteins". Ils sont aussi anti-apoptotiques. La génération de fragments de faible PM, résultant éventuellement d'activités différentielles des hyaluronidases, peut survenir dans des conditions d'inflammation, de tumorigénèse et de blessure tissulaire (Stern, 2003).

Étant donné les nombreuses fonctions spécifiques remplies par les polymères d'HA de taille précise, la synthèse et la dégradation de l'HA, effectuées respectivement par les HAS et les hyaluronidases, doivent être parfaitement régulées.

1.1.3. Synthèse de l'acide hyaluronique

1.1.3.1. Les hyaluronan synthases

Les enzymes synthétisant l'HA, ou HAS, sont des protéines transmembranaires difficiles à étudier étant donné qu'elles perdent leur activité lorsqu'elles sont solubilisées. Elles n'ont pas été décrites avant les années 1990, lorsque DeAngelis et ses collaborateurs ont découvert et caractérisé le premier gène (*has1*) encodant une HAS dans le streptocoque du groupe A (DeAngelis *et al.*, 1993 (a) ; DeAngelis *et al.*, 1993 (b) ; Weigel *et al.*, 1997). Quelques années plus tard, trois isoformes de HAS eucaryotes, provenant des gènes *Has1*, *Has2* et *Has3*, ont été identifiées chez l'homme et la souris. Ces gènes codent pour des protéines qui produisent chacune un polymère d'HA d'une certaine taille et qui présentent entre elles une homologie de séquence de 55 à 71% (Spicer and McDonald, 1998 (a) ; Spicer and McDonald, 1998 (b)) (Figure 1.2).

Les gènes codant pour ces trois HAS eucaryotes sont localisés sur des chromosomes différents. Le gène *HAS1* se trouve sur le chromosome 19 (19q13.3-13.4) (Spicer and McDonald, 1998 (b)) et code pour la protéine HAS1 qui est la moins active et mène à la synthèse d'HA de haut PM (2.000 kDa). Le gène *HAS2* est localisé sur le chromosome 8 (8q24.12) (Spicer and McDonald, 1998 (b)) et code pour l'HAS2 qui génère également des formes d'HA de haut PM (2.000 kDa). Le gène *HAS2* est exprimé lors du développement embryonnaire et la synthèse d'HA assurée par l'HAS2 pourrait jouer un rôle important dans l'expansion et la croissance tissulaires. La protéine HAS3, codée par le gène *HAS3* situé sur le chromosome 16 (16q22.1) (Spicer and McDonald, 1998 (b)), est l'enzyme la plus active ; elle permet la synthèse de grandes quantités de chaînes d'HA de faible PM (100-1.000 kDa). L'*HAS3* est exprimée plus tard dans le développement embryonnaire et dans de nombreux tissus adultes. L'HA produit par l'HAS3 pourrait fournir le glycocalyx péricellulaire et interagir avec les récepteurs de l'HA. De telles chaînes d'HA pourraient cibler les cascades de transduction du signal et induire des changements majeurs dans le comportement cellulaire (Stern, 2005).

La localisation des gènes *Has* sur différents chromosomes et les structures génomiques conservées suggèrent que cette famille de gènes est ancienne et que ces trois gènes résultent de deux duplications géniques à partir d'un ancêtre commun, le gène *Has1* s'étant ensuite séparé des gènes *Has2* et *Has3* (Weigel *et al.*, 1997 ; Spicer and McDonald, 1998 (a)) (Figure 1.3).

Des souris knock-out pour les différents gènes *Has* ont été réalisées ; celles qui sont déficientes pour *Has1* ou *Has3* sont viables et ne présentent pas de phénotype évident, alors que les souris déficientes pour *Has2* meurent au cours du développement embryonnaire suite à des défauts cardiaques. La biosynthèse de l'HA par HAS2 est donc requise pour un développement embryonnaire normal alors que celle assurée par HAS1 ou HAS3 n'est pas indispensable (Spicer and McDonald, 1998 (b)).

1.1.3.2. Mécanisme de synthèse

En 1983, Prehm propose un mécanisme pour la synthèse de l'HA différent de celui des autres GAG (Prehm *et al.*, 1983) (Figure 1.4). En utilisant comme substrats l'acide uridine diphospho-glucuronique (UDP-GlcA) et l'uridine diphospho-N-acétylglucosamine (UDP-GlcNAc), les HAS polymériseraient les chaînes d'HA sur la face interne de la membrane plasmique au contraire des autres GAG qui sont synthétisées au niveau de l'appareil de Golgi. Les HAS catalysent la formation de deux liens glycosidiques différents, les liens $\beta(1-3)$ et $\beta(1-4)$. Lors de la synthèse, les polymères d'HA sont extrudés par un mécanisme inconnu à travers la membrane plasmique dans le glycocalyx ou dans la MEC (Stern, 2004 (a)). Il semble que les HAS elles-mêmes sont impliquées dans la translocation du polymère au fur et à mesure de sa croissance à travers la membrane cellulaire. Les HAS eucaryotiques formeraient un pore ou un canal dans la membrane plasmique par lequel la chaîne d'HA serait extrudée (Spicer and McDonald, 1998 (b)). L'extrusion de la chaîne d'HA permettrait la croissance libre du polymère jusqu'à des tailles de 1.000-10.000 kDa. En effet, la synthèse d'un tel polymère contenant plus de 25.000 disaccharides serait probablement impossible à l'intérieur de la cellule (Stern, 2005).

1.1.4. La dégradation de l'acide hyaluronique

1.1.4.1. Dégradation enzymatique : les hyaluronidases

1.1.4.1.1. Classification

La caractérisation des enzymes qui dégradent l'HA dans les tissus somatiques, à savoir les hyaluronidases, n'a pu être réalisée que récemment. En effet, ces enzymes existent en quantité très faible, possèdent une activité instable et nécessitent la présence constante d'inhibiteurs de protéases et de détergents lors des procédures de purification afin de maintenir leur activité (Stern and Csoka, 2000). Une fois purifiées, en revanche, les hyaluronidases sont parfaitement stables.

L'activité hyaluronidasique fut identifiée pour la première fois dans des extraits testiculaires de lapin. Cet agent favorisant la diffusion des virus fut nommé "spreading factor" (décrit dans : Fiszler-Szafarz *et al.*, 2000). En 1940, Karl Meyer introduisit le terme d'hyaluronidase, plus précis. Il classa les différentes hyaluronidases en trois groupes en

fonction d'informations biochimiques et de l'analyse des produits générés. Avec l'évolution des données génétiques et moléculaires, il a pu être établi que cette classification était remarquablement précise (Stern and Csoka, 2000). La voici :

- Groupe 1 : Les hyaluronidases de bactéries sont des endo- β -N-acétyl-hexosaminidases qui dégradent l'HA en disaccharides et clivent également d'autres GAG comme la chondroïtine sulfate, le dermatan sulfate, etc.
- Groupe 2 : Certaines hyaluronidases sont des endo- β -glucuronidases qui fragmentent l'HA en tétrasaccharides et en hexasaccharides ; on les trouve dans les sangsues, crustacés et autres parasites.
- Groupe 3 : Les hyaluronidases de mammifères sont des endo- β -N-acétyl-hexosaminidases possédant une activité hydrolytique et produisant principalement des tétrasaccharides et des hexasaccharides. Ces hyaluronidases manquent de spécificité et dégradent d'autres GAG telles que la chondroïtine et la chondroïtine-sulfate. Les hyaluronidases mammaliennes présentent également des activités de transglycosylation. Dans la nature, l'HA et la chondroïtine sulfate peuvent coexister et se lier l'une à l'autre. La réaction de transglycosylation des hyaluronidases mammaliennes permet de générer des molécules hybrides *in vitro* entre les deux GAG. Des études supplémentaires doivent être réalisées afin de savoir si une telle réaction se passe *in vivo* et si ces molécules hybrides ont une fonction biologique.

Dans le génome humain, six gènes groupés sur deux régions chromosomiques codent pour des hyaluronidases du groupe 3 (Figure 1.5). Les trois gènes *HYAL-1*, *HYAL-2* et *HYAL-3* codant pour les protéines HYAL-1, HYAL-2 et HYAL-3 sont situés sur le chromosome 3p21.3. Les trois autres gènes, *HYAL-4*, *HYAL-P1* et *SPAM-1* (Sperm Adhesion Molecule 1), sont regroupés sur le chromosome 7q31.3. Ils codent respectivement pour HYAL-4, pour un pseudogène transcrit mais non traduit chez l'homme (HYAL-P1), et pour PH-20, l'hyaluronidase principale du spermatozoïde. Les hyaluronidases constituent une famille d'enzymes hautement homologues. Les six paralogues présentent entre eux environ 40% d'identité en acides aminés (Csoka *et al.*, 1999 ; Csoka *et al.*, 2001).

La présence d'un tel motif chromosomique suggère que les six premières séquences présentes dans le génome mammalien découlent probablement de deux duplications, formant trois gènes, suivies par une duplication en masse générant six gènes. De plus, le degré d'homologie entre les orthologues humain et murin d'*Hyal-1*, *Hyal-2* et *Spam-1* est plus grand qu'entre les six paralogues humains, indiquant que la divergence entre les paralogues s'est passée longtemps avant la divergence entre humains et souris (Csoka *et al.*, 1999 ; Csoka *et al.*, 2001).

Les structures des 6 gènes des hyaluronidases sont détaillées à la Figure 1.6. Les gènes situés sur le chromosome 3 présentent une structure génomique similaire au niveau de l'arrangement des introns et des exons. Les trois gènes d'hyaluronidases groupés sur le chromosome 7 contiennent des introns plus larges que ceux du chromosome 3 à cause de leur pourcentage élevé de séquences non codantes. Ils contiennent également un exon supplémentaire (Stern and Csoka, 2000).

1.1.4.1.2. L'hyaluronidase 1 (HYAL-1)

Cette hyaluronidase active à pH acide est connue depuis des décennies mais n'a été isolée que récemment. Il s'agit de la première hyaluronidase isolée à partir du plasma qui ait ensuite été clonée, séquencée et exprimée (Stern and Csoka, 2000). HYAL-1 est une enzyme ubiquiste et ses taux les plus élevés d'ARNm se situent dans les organes parenchymateux tels que le foie, le cœur, la rate et les reins. Cette hyaluronidase est capable d'utiliser l'HA de taille quelconque comme substrat et génère surtout des tétrasaccharides (Stern, 2004 (a)).

Cette enzyme de 57 kDa est constituée d'une chaîne polypeptidique de 49 kDa avec 8 kDa ajoutés par glycosylation post-traductionnelle. L'urine, longtemps connue pour présenter des niveaux élevés d'activité hyaluronidasique, contient une forme d'HYAL-1 avec une activité spécifique 100 fois plus élevée que celle trouvée dans le plasma. L'urine humaine contient également une forme processée de 45 kDa qui résulte d'une délétion de 100 acides aminés dans la région carboxy-terminale générant deux chaînes peptidiques liées par des ponts disulfures (Stern and Csoka, 2000) (Figure 1.7). Ces deux formes urinaires d'HYAL-1 ont des activités similaires.

1.1.4.1.3. L'hyaluronidase 2 (HYAL-2)

HYAL-2 a tout d'abord été considérée comme une enzyme spécifique aux lysosomes (Lepperdinger *et al.*, 1998) mais aucune autre expérience n'a démontré sa localisation lysosomale. Il a ensuite été observé qu'elle se trouvait ancrée en membrane plasmique par un lien glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Rai *et al.*, 2001). En effet, l'analyse de la séquence de 473 acides aminés de la protéine HYAL-2 indique la présence d'une séquence signal d'environ 20 résidus en position N-terminale qui dirige HYAL-2 à la surface cellulaire et d'une extrémité carboxy-terminale hydrophobe présentant les caractéristiques pour être remplacée par une ancre GPI (Rai *et al.*, 2001) (Figure 1.8).

HYAL-2 possède une faible activité de dégradation ; elle cliverait l'HA de haut PM en un produit d'environ 20 kDa qui servirait de substrat pour d'autres hyaluronidases telles que PH-20 et HYAL-1 (Lepperdinger *et al.*, 1998 ; Rai *et al.*, 2001). Ceci reste toutefois hypothétique.

Lepperdinger et ses collègues (Lepperdinger *et al.*, 2001) ont tenté de générer des souris knock-out pour *Hyal-2* mais aucun animal -/- n'a été obtenu. Depuis, aucune publication sur ces recherches n'a été éditée, mais des souris KO conditionnelles ont été générées et seront prochainement analysées dans le laboratoire de Physiologie et Pharmacologie.

Etant donné qu'HYAL-2 est le sujet principal de ce travail, elle sera développée plus en détails au point 1.1.4.2.

1.1.4.1.4. L'hyaluronidase 3 (HYAL-3)

Actuellement, HYAL-3 n'a toujours pas été caractérisée (Udabage *et al.*, 2005). Son ARNm est détecté dans les testicules mammaliens ainsi que dans la moelle osseuse, deux tissus possédant des cellules souches. Il a été suggéré qu'HYAL-3 serait exprimée au cours de la vie fœtale et pourrait intervenir dans la régulation des cellules souches (Stern and Csoka, 2000), mais cela n'a pas été confirmé.

L'expression d'HYAL-3 est également décelée dans les chondrocytes et augmente lorsque les fibroblastes se différencient en chondrocytes (Stern, 2003).

1.1.4.1.5. L'hyaluronidase 4 (HYAL-4)

HYAL-4 est la première enzyme identifiée dans les tissus vertébrés qui serait purement une chondroïtinase. Elle possède également une ancre GPI et son expression est restreinte au placenta et aux muscles squelettiques (Csoka *et al.*, 1999). Elle possède une spécificité absolue pour la chondroïtine et la chondroïtine sulfate et n'a pas la capacité de dégrader l'HA. Une activité chondroïtinase codée par cette famille de gènes n'est pas surprenante étant donné que les hyaluronidases de vertébrés ont la capacité de cliver la chondroïtine sulfate, bien que dans une mesure limitée. De plus, la structure de la chondroïtine est très proche de celle de l'HA, les différences étant que la N-acétylglucosamine de l'HA est remplacée par la N-acétylgalactosamine dans la chondroïtine.

1.1.4.1.6. PH-20

L'hyaluronidase PH-20 est une enzyme qui facilite la pénétration du spermatozoïde à travers la masse de cumulus entourant l'ovule ; elle est impliquée dans la fertilisation. Par des techniques plus sensibles dont la PCR (Polymerase Chain Reaction), *SPAM-1*, le gène encodant PH-20, peut être détecté dans l'épididyme, les vésicules séminales, la prostate, le tractus génital femelle, le sein, le tissu placentaire et fœtal ainsi que dans certains tissus malins. PH-20 peut aussi être trouvée dans l'épithélium tubulaire rénal sous une forme non associée à l'activité hyaluronidasique. Ce manque d'activité est attribué à un changement du niveau de glycosylation (Stern, 2005).

PH-20 est synthétisée sous forme d'un large polypeptide attaché à la membrane par une ancre GPI. Elle peut alors être processée pour former une protéine soluble composée de deux polypeptides liés par un pont disulfure (Stern and Csoka, 2000).

1.1.4.1.7. L'hyaluronidase 5 (HYAL-5)

Dernièrement, Kim et ses collègues (Kim *et al.*, 2005) ont découvert une nouvelle hyaluronidase qui permet au sperme de souris déficientes en PH-20 de pénétrer la masse du cumulus. Cette protéine de 55 kDa hydrolysant l'HA a été nommée hyaluronidase 5 ; elle est abondamment présente dans le sperme de souris. Elle est exclusivement exprimée dans le testicule et est située dans les membranes plasmique et acrosomale du spermatozoïde. Le gène codant cette enzyme est situé sur le chromosome 6 de la souris avec les gènes *Hyal-p1*, *Hyal-4* et *Spam-1*. La séquence d'*Hyal-5* est relativement divergente d'*Hyal-1*, *Hyal-2*,

Hyal-4 et *Hyal-p1* murin (32 à 36 % d'identité). Jusqu'à présent, chez l'homme, aucun gène *HYAL-5* n'a été découvert.

1.1.4.1.8. HYAL-P1

HYAL-P1 est un pseudogène chez l'homme et n'est donc pas traduit en enzyme active étant donné qu'il possède des codons stop aberrants. Les quelques mutations dans la séquence humaine indiquent qu'*HYAL-P1* pourrait avoir dégénéré récemment et pourrait encoder une enzyme fonctionnelle dans d'autres espèces comme la souris (Csoka *et al.*, 1999).

1.1.4.2. L'hyaluronidase 2

1.1.4.2.1. Distribution tissulaire et localisation subcellulaire

Des Northern blots de tissus humains et des Western blots de tissus murins ont révélé la présence d'ARNm d'*HYAL-2* et de la protéine dans de nombreux tissus à l'exception du cerveau adulte (Lepperdinger *et al.*, 1998). Une étude plus détaillée a révélé que le gène *HYAL-2* est exprimé dans le cerveau d'embryon de souris mais est éteint une à deux semaines après la naissance. La transcription réduite du gène *Hyal-2* murin après la naissance est causée par la méthylation *de novo* d'îlots CpG présents dans le promoteur et la région 5' non traduite (Lepperdinger *et al.*, 2001), suggérant un rôle d'*HYAL-2* dans le développement du cerveau.

La localisation subcellulaire de la protéine *HYAL-2* est apparemment plus complexe qu'imaginée au départ. Sa large distribution et son pH optimum acide ont fait penser qu'il s'agissait d'une enzyme lysosomale. Cette impression a été renforcée par les résultats d'expériences effectuées à l'aide d'une protéine de fusion *HYAL-2*-GFP ("green fluorescent protein") qui était colocalisée avec le Lysotracker Red dans les lysosomes (Lepperdinger, 1998). Cependant, quelques années plus tard, l'expression d'*HYAL-2* a également été détectée dans la fraction membranaire. Des expériences utilisant la phosphatidylinositol-phospholipase C et des analyses de séquence ont suggéré qu'une partie des protéines *HYAL-2* est liée à la membrane plasmique via une ancre GPI (Rai *et al.*, 2001). De plus, il a été démontré qu'*HYAL-2* est le récepteur membranaire d'un virus ovin, le JSRV (Jaagsiekte sheep retrovirus) (Rai *et al.*, 2000). Il faut relever que Lepperdinger avait construit la protéine de fusion *HYAL-2*-GFP en ajoutant la GFP à l'extrémité carboxy-terminale d'*HYAL-2*, ce qui a probablement rompu le traitement normal de l'ancre GPI ou conduit au clivage de l'étiquette GFP, de sorte que la fluorescence de la GFP n'indiquait pas nécessairement la localisation d'*HYAL-2*. En résumé, *HYAL-2* est fort probablement située à la membrane plasmique mais d'autres localisations subcellulaires ne sont pas exclues.

1.1.4.2.2. Structure génomique et régulation

Bien que la séquence du gène *HYAL-2* humaine est connue depuis longtemps et qu'*HYAL-2* semble impliquée dans de nombreux processus biologiques dont le développement embryonnaire, l'inflammation et la croissance tumorale, sa régulation reste peu étudiée. Il a été montré que la structure génomique d'*HYAL-2* humain consiste en 4 exons séparés par trois introns, et que le site d'initiation de la traduction est localisé dans l'exon 2 (Csoka *et al.*, 2001). Plus récemment, il a été observé que la région 5' du gène *HYAL-2*

présente de multiples sites initiateurs de transcription et qu'elle ne contient pas de "TATA box". Ces observations sont caractéristiques des "house-keeping genes", gènes actifs de façon constitutive. Elles sont peu compatibles avec l'augmentation des niveaux d'HYAL-2 lors du développement embryonnaire ou dans les tumeurs. De même, la présence d'éléments cis régulateurs négatifs et positifs a été étudiée dans les chondrocytes (Chow and Knudson, 2005). Il semble que le catabolisme de l'HA n'implique pas de changements dans l'expression de l'ARNm d'*HYAL-2* ou de la protéine, mais qu'il dépende d'une régulation de l'endocytose d'HA médiée par le récepteur CD44.

1.1.4.2.3. Fonctions

L'activité enzymatique d'HYAL-2 est considérablement plus faible que celle de PH-20 et des autres hyaluronidases. Selon Lepperdinger (Lepperdinger *et al.*, 2001), l'hydrolyse de l'HA de haut PM comme celui du cordon ombilical ou de la capsule des *Streptococcus*, par HYAL-2 exprimée par transfection cellulaire produit un polysaccharide d'environ 20 kDa correspondant à 50-60 disaccharides. Ce genre de fragment posséderait des fonctions biologiques propres et servirait de substrat aux autres hyaluronidases. Toujours selon Lepperdinger, l'activité d'HYAL-2 présente un optimum prononcé à pH 4 mais clive également l'HA à un faible niveau en conditions plus neutres. Une meilleure caractérisation des propriétés enzymatiques d'HYAL-2 sera possible une fois la protéine mieux purifiée.

Plusieurs études ont démontré qu'HYAL-2 était le récepteur d'un rétrovirus, le Jaagsiekte Sheep Rétrovirus (JSRV), provoquant la maladie de Jaag chez le mouton. Il s'agit d'un cancer pulmonaire infectieux, dont les caractéristiques sont voisines des cancers bronchiolo-alvéolaires humains. Différentes lignées cellulaires transfectées avec l'ADNc d'*HYAL-2* deviennent susceptibles d'être infectées par le JSRV (Rai *et al.*, 2001 ; Lepperdinger *et al.*, 2001). Il a également été montré qu'HYAL-2 est un récepteur pour des virus endogènes de type JSRV chez le mouton (Dunlap *et al.*, 2005). Les rétrovirus endogènes (ERVs) sont dérivés d'événements d'intégration dans la lignée germinale d'espèces animales hôtes lors de l'évolution d'anciens rétrovirus exogènes. Généralement, ils sont transcriptionnellement silencieux et sont souvent défectueux suite à des délétions ou à des mutations qui les rendent incapables de former des virus infectieux. Cependant, il arrive que des ERVs maintiennent plusieurs "open reading frames" intacts et soient exprimés, avec des effets bénéfiques ou non pour l'hôte. Chez l'homme et les primates, les ERVs seraient indispensables au développement, à certaines fonctions physiologiques et notamment à la formation du syncytiotrophoblaste placentaire (Dunlap *et al.*, 2005).

L'exemple de l'enJSRV (bétarétrovirus endogène) est intéressant (Dunlap *et al.*, 2005). Cette séquence virale est transcriptionnellement active dans les fœtus ovins et les moutons adultes, particulièrement dans le tractus reproductif femelle, où sa présence entraîne l'apparition d'une protéine membranaire Env (enveloppe). L'enJSRV pourrait avoir des rôles biologiques bénéfiques pour l'hôte :

- la protection contre les virus infectieux exogènes tels que JSRV,
- la suppression de la reconnaissance immune de l'embryon,
- la morphogenèse placentaire.

La localisation et la chronologie de l'expression d'enJSRV suggèrent qu'il joue un rôle dans la différenciation des cellules du trophoblaste ainsi que dans leur fusion avec l'épithélium de la lumière endométriale pour former les plaques syncytiales. Il a été découvert que la protéine env d'enJSRV utilise HYAL-2 comme récepteur, et que HYAL-2 est présent en abondance dans le trophoblaste, mais la capacité des différentes formes d'env d'induire la fusion cellulaire et la formation du syncytium n'a pas encore été démontrée (Dunlap *et al.*, 2005).

1.1.4.3. Dégradation non enzymatique de l'HA

In vitro, des substances telles que l'acide ascorbique, la cystéine et les sels ferreux, en absence ou en présence de peroxyde d'hydrogène, dégradent l'HA. Les radicaux libres, spécialement les radicaux hydroxyles hautement réactifs, jouent un rôle important dans ce mode de dégradation de l'HA (Uchiyama *et al.*, 1990). Ces radicaux libres sont, par exemple, générés dans les premières étapes de cicatrisation en présence de myéloperoxydases des leucocytes polymorphonucléaires (Stern, 2004 (a)). Dans certaines conditions pathologiques, les radicaux libres et les hyaluronidases pourraient avoir des activités de dégradation de l'HA coordonnées (Stern, 2005).

1.1.4.4. Cycle catabolique

La dégradation de l'HA est en majeure partie enzymatique et se passe en différentes étapes dans les tissus somatiques. Les fragments générés présentent des activités spécifiques, ce qui montre que la cascade de fragmentation de l'HA est hautement contrôlée. Un modèle a été proposé suggérant qu'HYAL-2 et HYAL-1 sont les principales hyaluronidases mammaiennes dans les tissus somatiques et qu'elles agissent en concert pour dégrader l'HA de haut PM en tétrasaccharides (Stern, 2004 (b)) (Figure 1.9).

Selon Stern, l'HA de haut PM serait ancré à la surface cellulaire externe par des récepteurs à l'HA comme CD44 ainsi que par HYAL-2. Le complexe HA-CD44-HYAL-2 serait enrichi dans les cavéoles, invaginations de la membrane plasmique riches en cholestérol et en gangliosides et appartenant aux radeaux lipidiques (lipid rafts). Selon d'autres auteurs, HYAL-2 interagirait avec CD44 et l'échangeur $\text{Na}^+\text{-H}^+$ NHE1 pour créer un micro-environnement acide permettant à HYAL-2 d'être active dans des conditions physiologiques (Bourguignon *et al.*, 2004). L'HA serait clivé par HYAL-2 en fragments de taille intermédiaire de 20 kDa qui seraient ensuite internalisés par endocytose médiée par récepteur, puis délivrés aux endosomes et aux lysosomes où HYAL-1 les dégraderait en oligomères de faible PM. Les deux β -exoglycosidases lysosomales, la β -glucuronidase et la β -N-acétylglucosaminidase, participeraient également à cette dégradation (Stern, 2005 ; Udabage, 2005). Les monosaccharides produits par le catabolisme de l'HA, la N-acétylglucosamine et l'acide glucuronique, pourraient alors diffuser des lysosomes dans le cytoplasme. La N-acétylglucosamine serait phosphorylée en N-acétylglucosamine-6-phosphate et, par l'action d'une N-acétylglucosamine déacétylase, une enzyme particulièrement active dans les cellules de Kupffer et les cellules endothéliales du foie, de la glucosamine-6-phosphate serait générée (Stern, 2004 (a)).

1.1.5. L'hyaluronasome

Certains auteurs ont évoqué un mini-organelle spécifique du métabolisme de l'HA qu'ils ont appelé hyaluronasome. Celui-ci serait situé sous, et partiellement encastré dans, la membrane plasmique et contiendrait un complexe multi-protéique rassemblant les activités synthétique et catabolique de l'HA. Cependant, l'existence de l'hyaluronasome est hautement spéculative (Stern, 2004 (a) ; Stern, 2004 (b)).

L'hyaluronasome serait capable de répondre aux événements extracellulaires aussi bien qu'à l'état métabolique intracellulaire. Il pourrait contenir des récepteurs à l'HA tels que RHAMM et CD44, des HAS, des hyaluronidases, des inhibiteurs d'hyaluronidases, des β -exoglycosidases et des protéines liant l'HA comme HABP1. Il pourrait réaliser un servo-mécanisme utilisant un récepteur tel que CD44 afin de relayer des messages de feedback permettant aux cellules de mesurer les taux d'HA synthétisés et extrudés. Etant donné que les taux d'HA doivent répondre aux différents états physiologiques de la cellule comme la croissance, la mitose, le détachement des cellules du substrat, etc., l'hyaluronasome régulerait le dépôt d'HA avec une grande précision (Stern, 2004 (a) ; Stern, 2004 (b)). Des travaux futurs devraient chercher à confirmer ou à moduler ce concept.

1.2. Les cancers

1.2.1. Caractéristiques des cancers

Les cellules cancéreuses, par définition, prolifèrent anormalement et sont capables d'envahir et de coloniser les tissus environnants. La plupart des cancers sont originaires d'une seule cellule normale ayant subi des altérations génétiques initiales et dont la progéniture subit davantage de changements et de mutations jusqu'à devenir cancéreuse. Les cellules cancéreuses évitent le suicide, la sénescence répllicative et les voies de différenciation qui pourraient restreindre leur capacité de croître et de se diviser (Alberts *et al.*, 2002).

Généralement, le développement d'un cancer requiert plusieurs étapes dépendantes de multiples facteurs, comme la constitution génétique de l'individu, l'environnement et la façon de vivre. En étudiant les cancers humains et les modèles animaux, il a été observé que le développement de tumeurs s'effectue par un processus analogue à l'évolution darwinienne, et qu'une succession de changements génétiques conduit à la conversion progressive des cellules humaines normales en cellules cancéreuses. Les cellules cancéreuses présentent des défauts dans les voies régulatrices gouvernant l'homéostasie et la prolifération. Six altérations essentielles dans la physiologie cellulaire conduisent à la croissance maligne :

- l'autosuffisance des signaux de prolifération,
- l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de prolifération,
- l'évitement de la mort cellulaire programmée (apoptose),
- le potentiel réplcatif moins limité,
- l'angiogénèse soutenue,
- l'invasion tissulaire et les métastases.

Chacun de ces changements physiologiques et de ces capacités nouvelles acquises lors du développement tumoral représente la rupture d'un mécanisme de défense anti-cancéreux présent dans les cellules et tissus.

1.2.1.1. Capacité acquise : autosuffisance des signaux de croissance

Les cellules normales nécessitent des signaux de croissance mitogéniques afin de passer d'un état quiescent à un état prolifératif actif (Evan and Vousden, 2001). Ces signaux sont transmis dans les cellules par des récepteurs transmembranaires qui lient différentes classes de molécules de signalisation : facteurs de croissance (GF) diffusibles, composants de la MEC et molécules d'adhésion et d'interaction cellule-cellule (Hanahan and Weinberg, 2000). Les cellules tumorales génèrent la majorité de leurs propres signaux de croissance et réduisent leur dépendance à la stimulation par leur microenvironnement tissulaire normal. Cette émancipation rompt un mécanisme homéostatique important.

Trois stratégies moléculaires communes permettent d'obtenir l'autonomie : les altérations de signaux de croissance extracellulaires, de transducteurs transcellulaires de ces signaux ou de voies de transduction intracellulaires du signal. Les cellules cancéreuses acquièrent la capacité de synthétiser des GF auxquels elles répondent, créant ainsi un feedback positif appelé stimulation autocrine (Hanahan and Weinberg, 2000).

1.2.1.2. Capacité acquise : insensibilité aux signaux anti-croissance

Dans un tissu normal, de multiples signaux anti-prolifératifs opèrent afin de maintenir la quiescence cellulaire et l'homéostasie tissulaire ; ces signaux incluent des inhibiteurs de croissance solubles et des inhibiteurs immobilisés dans la MEC et à la surface des cellules (Hanahan and Weinberg, 2000). Ces inhibiteurs de croissance se lient à des récepteurs de surface membranaire couplés à certaines voies de transduction du signal (Weinberg, 1995).

Les signaux anti-croissance peuvent bloquer la prolifération par deux mécanismes distincts. D'une part, les cellules peuvent être maintenues hors du cycle cellulaire dans un état quiescent (Go) duquel elles peuvent sortir en présence de signaux extracellulaires. D'autre part, les cellules peuvent être conditionnées afin de renoncer de manière permanente à leur potentiel prolifératif en entrant dans un état post-mitotique, souvent associé à l'acquisition de traits spécifiques liés à la différenciation. Afin de prospérer, les cellules cancéreuses doivent esquiver ces signaux anti-prolifératifs (Hanahan and Weinberg, 2000 ; Evan and Vousden, 2001).

La plupart des voies permettant aux cellules de répondre aux signaux anti-croissance sont associées au cycle cellulaire, en particulier aux composants contrôlant le transit dans la phase G1 du cycle. Les cellules sont sensibles à l'environnement extérieur lors de cette période et, sur base des signaux, elles décident d'entrer en prolifération, d'être quiescentes ou d'entrer dans un état post-mitotique (Hanahan and Weinberg, 2000).

1.2.1.3. Capacité acquise : éviter l'apoptose

L'apoptose est le nom donné à un processus cellulaire normal, la mort cellulaire programmée, qui implique une série d'événements hautement contrôlés et régulés conduisant à l'élimination de cellules ciblées (Lawry, 2003). Ce processus a des implications dans la biologie du développement et l'homéostasie des tissus (Weinberg, 1995). Dans les tissus adultes normaux, les cellules prolifèrent continuellement mais leur nombre reste stable étant donné que la production cellulaire est contre-balançée par la perte cellulaire. Si trop de

cellules sont produites, le taux d'apoptose augmente afin d'éliminer le surplus. La mort cellulaire programmée, l'apoptose, joue donc un rôle essentiel dans cet équilibre (Alberts *et al.*, 2002).

Le programme apoptotique est présent sous une forme latente dans tous les types cellulaires. Une fois ciblé par une variété de signaux physiologiques, ce programme entame une série d'étapes précises. D'un point de vue morphologique, les membranes cellulaires sont rompues, les charpentes nucléaire et cellulaire sont cassées, le cytosol est extrudé, les chromosomes sont dégradés et le noyau est fragmenté (Hanahan *et al.*, 2000).

La machinerie apoptotique peut être divisée en deux classes de composants : les senseurs et les effecteurs. Les senseurs sont responsables du contrôle des environnements intra- et extracellulaire. Ces sentinelles incluent des récepteurs de surface cellulaire qui lient des facteurs de survie ou de mort. Les signaux perçus par les senseurs tels que l'hypoxie ou les dommages à l'ADN régulent la seconde classe de composants qui fonctionnent comme effecteurs de mort apoptotique. Ceux-ci incluent un ensemble de protéases intracellulaires appelées caspases. Deux caspases, les caspases 8 et 9, sont activées par des récepteurs de mort (Hanahan and Weinberg, 2000) ou par le cytochrome C libéré de la mitochondrie (Evan and Vousden, 2001). Ces caspases ciblent l'activation de plus d'une douzaine de caspases effectrices qui exécutent le programme de mort par destruction sélective de structures subcellulaires, d'organelles et du génome (Hanahan and Weinberg, 2000).

La base génétique de l'apoptose implique que la mort cellulaire peut être perturbée suite à des mutations. En fait, des défauts dans la voie apoptotique sont responsables d'un certain nombre de maladies humaines allant des désordres neurodégénératifs au cancer (Weinberg, 1995).

L'une des propriétés les plus importantes des cellules cancéreuses est donc d'éviter ce suicide (Alberts *et al.*, 2002). Les cellules des cancers humains acquièrent la résistance à l'apoptose par une variété de stratégies. La plus commune est la perte de régulateur pro-apoptotique par des mutations impliquant le gène suppresseur de tumeur (TSG) p53 (Hanahan and Weinberg, 2000).

1.2.1.4. Capacité acquise : potentiel réplcatif moins limité

La sénescence est une réponse programmée dans le but de protéger les cellules des dommages à l'ADN en empêchant la progression du cycle cellulaire. Lorsque le nombre critique de divisions cellulaires est atteint, la cellule subit des changements dans la morphologie et l'expression de gènes et arrête de croître. L'arrêt prolongé associé à la sénescence limite le nombre de sites mutés requis pour la tumorigenèse, montrant que la sénescence constitue un mécanisme suppresseur de tumeur (Jardine, 2003).

La sénescence réplcative est associée à une diminution de la longueur des télomères, ces derniers étant composés de plusieurs centaines de répétitions d'une séquence de six paires de bases. Ce raccourcissement progressif est dû à l'incapacité des ADN polymérases de répliquer entièrement l'extrémité 3' de l'ADN chromosomique lors de chaque phase S (Hanahan and Weinberg, 2000). Des répétitions sont ajoutées aux télomères par une enzyme, la télomérase. Cependant, dans les cellules somatiques normales, celle-ci étant inactive, les télomères se raccourcissent à chaque division cellulaire. Sous une certaine longueur critique

des télomères, les cellules entrent en sénescence (Jardine, 2003). Afin d'échapper à la sénescence, les cellules tumorales réactivent la télomérase pour maintenir la longueur des télomères au-dessus d'un seuil critique et permettre la multiplication illimitée des cellules descendantes (Hanahan and Weinberg, 2000).

1.2.1.5. Capacité acquise : angiogénèse soutenue

L'oxygène et les nutriments apportés par le système vasculaire sont cruciaux pour la fonction cellulaire et la survie. Une fois le tissu formé, la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins, processus nommé angiogénèse, est transitoire et finement régulée. Afin de croître davantage, les cellules tumorales doivent induire l'angiogénèse. La capacité d'induire et de maintenir l'angiogénèse semble être acquise lors du développement tumoral par un switch angiogénique. Les différents types de cellules tumorales utilisent des stratégies moléculaires distinctes, qui ne seront pas détaillées ici, pour activer le switch angiogénique (Hanahan and Weinberg, 2000 ; Scott, 2003(a)).

1.2.1.6. Capacité acquise : invasion tissulaire et métastases

Tôt ou tard dans le développement de cancers humains, les masses tumorales primaires engendrent des cellules pionnières qui se déplacent, envahissent les tissus adjacents et forment de nouvelles colonies. La capacité d'invasion et de métastase permet aux cellules cancéreuses d'échapper à la masse tumorale primaire et de coloniser un nouveau site dans le corps, où, au moins initialement, les nutriments et l'espace ne seront pas limitants. Le processus de métastase implique une série d'événements complexes comprenant le détachement de la cellule parentale, le départ des cellules de la tumeur primaire, l'envahissement des tissus et vaisseaux, le transport dans les capillaires ou vaisseaux lymphatiques, l'attachement des cellules tumorales au site secondaire et la survie et la croissance de la masse tumorale secondaire (Scott, 2003 (b) ; Alberts *et al.*, 2002). Chacun de ces événements est en lui-même complexe et les mécanismes moléculaires impliqués ne sont pas encore clairs.

Des protéases actives à la surface cellulaire pourraient faciliter l'invasion des cellules cancéreuses dans le stroma, à travers la paroi des vaisseaux et dans les cellules épithéliales. L'activation de protéases extracellulaires et les processus d'adhésion sont des étapes importantes pour l'acquisition de capacités invasives et métastatiques (Hanahan and Weinberg, 2000). Les molécules d'adhésion forment des liens protéine-protéine ou protéine-carbohydre à la surface cellulaire ainsi que des associations avec des protéines cytoplasmiques qui permettent l'interaction avec le cytosquelette et les voies de transduction du signal. Les molécules d'adhésion ne connectent pas seulement les cellules avec d'autres cellules et la MEC mais participent également aux voies de transduction du signal dans la cellule (Scott, 2003 (b)).

Pour envahir différents organes, les cellules tumorales acquièrent un nombre de caractéristiques hautement différenciées qui définissent le phénotype métastatique. Aucune des fonctions des cellules métastatisantes n'est unique au cancer puisqu'elles sont présentes lors de l'implantation du trophoblaste, du développement embryonnaire et du remodelage des tissus. La différence entre les processus normaux et la nature de l'invasion cancéreuse est une

dérégulation qui peut être attribuée à un taux de mutation élevé et à une instabilité génétique (Scott, 2003 (b)).

1.2.2. L'acide hyaluronique dans les cancers

Les taux d'HA autour des cellules tumorales sont généralement corrélés avec l'agressivité tumorale (Stern and Csoka, 2000). Cet HA pourrait être le produit des cellules tumorales elles-mêmes ou des cellules stromales péri-tumorales sous le commandement des cellules cancéreuses. Il est évident que l'HA et ses oligomères contribuent de multiples manières au phénotype malin (Toole, 2002) :

- Tout d'abord, l'augmentation du détachement et de la motilité des cellules malignes est due, au moins partiellement, à l'accumulation d'HA qui fournit un environnement hydraté facilitant la migration des cellules tumorales vers des sites éloignés.
- Ensuite, l'augmentation des interactions entre l'HA et les récepteurs de surface ou intracellulaires tels que CD44 et RHAMM active des voies de signalisation pro-invasives.
- Finalement, l'invasion et la migration tumorales pourraient être liées à une synthèse accrue d'HA stromal via l'interaction des fibroblastes avec les cellules tumorales (Boregowda *et al.*, 2006).

Une des étapes initiales dans le processus de métastase requiert l'adhésion des cellules tumorales à la MEC permettant l'invasion. Les mécanismes moléculaires favorisant cette adhésion ne sont pas complètement élucidés mais semblent impliquer des molécules de surface cellulaire telles que l'HA. L'HA faciliterait l'adhésion via un ou plusieurs de ses récepteurs tels que CD44 et RHAMM. Les larges matrices péricellulaires d'HA produites par les HAS adhèrent fortement à la laminine, un composant majeur du pourtour de la membrane basale, suggérant que l'HA péricellulaire faciliterait l'adhésion des cellules à la membrane basale, une étape précoce dans l'invasion tumorale et les métastases (Laurich *et al.*, 2004).

De plus, il a été démontré que les fragments d'HA induisent l'angiogénèse et favorisent la migration et la différenciation des cellules endothéliales. La dégradation d'HA autour des vaisseaux sanguins pourrait aussi augmenter les métastases en facilitant l'entrée des cellules tumorales dans la circulation (Udabage *et al.*, 2005).

Une des caractéristiques fondamentales du phénotype malin est la croissance indépendante de l'ancrage, événement auquel l'HA participerait. La capacité des cellules tumorales de croître d'une manière indépendante de l'ancrage a été liée à l'activation de la voie de survie cellulaire phosphoinositide3-kinase (Pi3K)/Akt (Ghatak *et al.*, 2002). La perturbation des interactions entre le polymère d'HA endogène et les cellules par traitement avec des oligomères d'HA inhibe la croissance des tumeurs *in vivo* et leur croissance indépendante de l'ancrage *in vitro*. Les oligomères d'HA déplaceraient l'HA endogène de son récepteur, CD44, supprimant la voie de signalisation (Pi3k)/Akt. Les oligomères d'HA stimulent l'expression de la PTEN, une phosphatase qui dégrade le produit de signalisation majeure de la Pi3k, le phosphoinositide 3,4,5-triphosphate (Ghatak *et al.*, 2002). Les fragments d'HA ont donc démontré, dans plusieurs types d'expériences, des effets suppresseurs de croissance tumorale ; ils peuvent aussi sensibiliser les cellules malignes aux agents chimiothérapeutiques (Stern, 2005).

1.2.3. Les hyaluronidases dans les cancers

Les hyaluronidases ont parfois été ajoutées aux régimes anticancéreux afin de sensibiliser les tumeurs aux chimiothérapies. En effet, les hyaluronidases augmentent la pénétration de drogues anti-cancéreuses en tant que "spreading factor". Cependant, par la suite, il a été découvert que les hyaluronidases possèdent une activité intrinsèque favorisant le cancer (Stern, 2005), et ce genre de traitement n'est plus utilisé actuellement en oncologie.

Les études réalisées sur le rôle d'HYAL-2 dans les cancers sont conflictuelles : cette enzyme pourrait fonctionner comme un oncogène ou un suppresseur de tumeur selon les cas.

1.2.3.1. L'hyaluronidase 2, un pro-cancéreux

HYAL-2 a été surexprimée dans des astrocytes murins ne contenant pas d'hyaluronidases endogènes : leur injection dans le cerveau de souris, mais pas dans le péritoine, a produit des tumeurs invasives et hautement vascularisées (Novak *et al.*, 1999 ; Lepperdinger *et al.*, 2001). Apparemment, l'expression d'HYAL-2 accélère la croissance tumorale intracérébrale (Novak *et al.*, 1999) et facilite l'invasion dans la MEC riche en HA du cerveau (Lepperdinger *et al.*, 2001). Cet effet serait très spécifique du tissu et peut-être du type tumoral.

L'HYAL-2 ovine ainsi que certains de ses orthologues sont les récepteurs au rétrovirus JSRV responsable d'un carcinome pulmonaire ovin. Cet élément, également très spécifique, a été décrit ci-avant (cf. 1.1.4.2.3.). Cependant, ce rôle ne fait pas automatiquement d'HYAL-2 un acteur pro-cancéreux. Au contraire (cf. ci-dessous), certaines protéines virales du JSRV pourraient inhiber la fonction du suppresseur tumoral d'HYAL-2.

Selon Lepperdinger, HYAL-2 clive l'HA de haut PM en fragments d'environ 20 kDa. Or, de tels fragments générés *in vitro* par d'autres méthodes (activité d'HYAL-1, sonication) stimulent l'angiogénèse. La capacité d'induire et de maintenir l'angiogénèse est acquise par un "switch" lors du développement tumoral qui changerait la balance entre les inducteurs et les inhibiteurs de l'angiogénèse. Les stratégies pour activer ce switch angiogénique varient en fonction du type de cellules tumorales (Hanahan and Weinberg, 2000). La surexpression d'HYAL-2 pourrait donc constituer l'un de ces « switches ». Ce point précis reste cependant à démontrer.

1.2.3.2. L'hyaluronidase 2, un suppresseur tumoral

Un ou plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs ont été identifiés comme faisant partie d'une région de 120 kb du chromosome 3p21.3, région où est situé le gène codant pour HYAL-2. La perte allélique de ce fragment est fréquente au cours du développement de plusieurs cancers dont ceux du sein et du poumon. Ces informations suggèrent qu'HYAL-2 pourrait être un TSG (Liu *et al.*, 2003). Cependant, l'identification de tels TSG est une tâche ardue étant donné que, lors des délétions, plusieurs gènes sont ôtés. Il a été montré par Ji et ses collègues que le développement de métastases est inhibé par le transfert de plusieurs gènes dont HYAL-2 (Ji *et al.*, 2002).

Les expériences explorant l'interaction entre JSRV, en particulier sa protéine d'enveloppe "env", et HYAL-2 semblent confirmer le rôle de TSG de ce dernier. Ainsi une construction FLAG-Env introduite dans des cellules exprimant HYAL-2 entraîne une diminution marquée du niveau de protéine env par rapport à la même construction introduite dans des cellules sans HYAL-2. Cette dernière pourrait donc entraîner la dégradation de env en s'y liant et empêcher l'activation de la transformation cellulaire (Liu *et al.*, 2003).

De plus, la protéine réceptrice HYAL-2 est associée avec le récepteur tyrosine kinase RON, un facteur potentiellement oncogène, et HYAL-2 pourrait l'inhiber de façon constitutive (Danilkovitch-Miagkova *et al.*, 2003). RON est un membre de la famille proto-oncogène des récepteurs tyrosine kinase (RTK) qui sont associés au développement tumoral et à la survie. Le gène RON humain est localisé dans la même région chromosomique 3p21 qu'*HYAL-2*, une observation étonnante. Le gène encodant le ligand de RON, une protéine stimulant les macrophages appelée MSP, est également localisé dans cette région. L'activation de RON par MSP stimule les voies de signalisation impliquées dans la progression tumorale et les métastases comme l'adhésion, l'invasion, la motilité, la prolifération et l'inhibition d'apoptose (Camp *et al.*, 2005). Suite à la liaison physique de la protéine env à HYAL-2, RON est libéré de son association avec HYAL-2 et devient fonctionnellement actif, probablement par autophosphorylation. L'activation de RON dans les cellules transformées par Env est associée à une activation des voies de signalisation Akt et MAPK (Mitogen-activated protein kinase) qui conduisent à la prolifération et à la survie cellulaires (Danilkovitch-Miagkova *et al.*, 2003) (Figure 1.10).

La transformation induite par env via l'activation de RON peut être annulée par l'expression ectopique d'une forme mutée de RON incapable d'activer les voies de signalisation Akt et MAPK. La surexpression de RON muté empêche l'activation des voies de signalisation Akt et MAPK et annule les propriétés de croissance des cellules transformées. Tout cela indique que l'activation de RON est essentielle pour la transformation et le maintien du phénotype transformé, et qu'*HYAL-2* pourrait servir de système de contrôle endogène sur RON. La surexpression d'*HYAL-2* bloque également la transformation induite par env (Danilkovitch-Miagkova *et al.*, 2003).

Un autre mécanisme par lequel *HYAL-2* pourrait contenir les cellules tumorales a été évoqué mais n'a pas encore été reproduit dans la littérature. En effet, *HYAL-2*, qui est souvent surexprimé dans les cancers du sein et de la prostate, augmente la sensibilité de ces cellules à la cytotoxicité du TNF (tumor necrosis factor) par des mécanismes complexes :

- *HYAL-2* induit l'expression de WOX1 (WW domain-containing oxidoreductase), une protéine pro-apoptotique. Lors de l'apoptose, la synthèse et la formation de complexes entre p53 et WOX1 sont augmentées dans le cytoplasme (Chang, 2002).
- La mitochondrie est un réservoir de protéines pro-apoptotiques et joue un rôle clé dans l'apoptose. Le complexe "TNF/récepteur au TNF" active la caspase 8, qui conduit à l'activation d'une protéine pro-apoptotique Bid de la famille de Bcl-2. Cette activation engendre une cascade de réactions conduisant à la formation de pores mitochondriaux et à l'activation de protéines pro-apoptotiques (telles que la caspase 9) qui, à leur tour, vont activer des nucléases qui vont fragmenter l'ADN. Lors de l'apoptose médiée par la staurosporine, une partie des molécules d'*HYAL-2* semblent migrer dans la mitochondrie où elles interagissent avec des protéines à la surface mitochondriale afin de modifier la perméabilité membranaire (Chang, 2002).
- Le TNF induit la phosphorylation de I κ B α suivie par sa dégradation dans le protéasome, autorisant l'activation de NF- κ B et sa translocation dans le noyau. NF- κ B

activé semble être essentiel dans le processus d'apoptose médiée par p53 (Chang, 2002). HYAL-2 augmenterait aussi ce phénomène.

1.3. La RNA interférence

En 1998, Andrew Fire et Craig Mello décrivent une nouvelle technologie basée sur l'extinction de gènes spécifiques par l'ARN double brin, une technologie qu'ils appellent la RNA interférence (RNAi) (McManus and Sharp, 2002). La RNAi est un processus endogène d'extinction de gènes à l'échelle post-transcriptionnelle dans les plantes et les animaux (Elbashir *et al.*, 2001).

Un contrôle hautement coordonné de l'expression génique est essentiel pour le développement normal et la différenciation ainsi que pour le maintien des fonctions cellulaires. En plus, la cellule a besoin de se protéger contre les effets potentiels de l'expression aberrante de matériel génétique "inutile" présent dans le génome. Jusqu'à présent, la plupart des recherches sur le contrôle de l'expression génique étaient focalisées sur la régulation des gènes aux niveaux génomique, transcriptionnel et traductionnel. Cependant, avec l'identification de la RNAi, le rôle de l'ARN comme médiateur et comme cible pour contrôler l'expression est devenu évident (Caplen, 2005).

Plusieurs technologies ont été utilisées dans le but de sous-réguler l'expression génique. Par exemple, les oligonucléotides anti-sens et les ribozymes ont été utilisés pendant plus d'une dizaine d'années pour cibler la dégradation spécifique d'ARN. Bien que ces méthodes fonctionnent de manière satisfaisante dans certains modèles expérimentaux simples, elles n'entraînaient généralement pas d'extinction de gènes efficace dans les systèmes mammaliens complexes. Au cours de ces dernières années, le développement de méthodes basées sur la RNAi a permis aux petits RNA d'interférence (siRNA) de devenir la technique principale utilisée par les chercheurs afin d'éteindre des gènes spécifiques (Elbashir *et al.*, 2001 ; Bantounas *et al.*, 2004). Les siRNA peuvent s'appliquer aussi bien à l'échelle cellulaire qu'au niveau de l'organisme entier (Caplen, 2005).

La première étape dans la voie de la technologie RNAi implique la transformation de longs fragments d'ARN double brin en siRNA de 21 à 23 nucléotides de long avec deux nucléotides simple brin flottants à l'extrémité 3' et un groupement phosphate à l'extrémité 5' (Caplen, 2005). Ce clivage est réalisé par une endonucléase appelée Dicer dont l'action se ferait par une translocation de l'enzyme dépendante de l'ATP le long de cet ARN double brin (Bantounas *et al.*, 2004). Suite au clivage de l'ARN double brin en siRNA, un complexe protéique nommé RISC (RNA-induced silencing complex) lie les siRNA qui le guident à sa cible où il entraîne la dégradation de l'ARNm cible. RISC est un complexe multi-protéique qui contient une activité hélicase et qui est activé d'une manière dépendante de l'ATP (Figure 1.11).

Les siRNA synthétiques de 21-22 paires de bases permettent d'éviter l'étape initiale avec Dicer tout en maintenant la capacité de médier l'extinction des gènes dans les cellules mammaliennes (Bantounas *et al.*, 2004). En effet, la RNAi peut être médiée par la délivrance exogène de siRNA qui sont reconnus par RISC dans le cytosol (Hollins *et al.*, 2005). Pour faciliter ces études, plusieurs techniques ont été développées pour synthétiser et cribler des siRNA (Bantounas *et al.*, 2004). Il semblerait qu'un seul des deux brins du siRNA soit incorporé par RISC. Il serait donc préférable de concevoir les siRNA de manière telle que ce

soit le brin anti-sens qui soit incorporé par RISC afin d'obtenir une extinction plus efficace. Plusieurs études ont montré que lorsque les siRNA sont thermodynamiquement instables ou même lorsqu'ils contiennent des mismatches à l'extrémité 5' du brin anti-sens, alors ce brin est préférentiellement utilisé par RISC, ce qui permet une extinction plus efficace (Bantounas *et al.*, 2004).

Tous les siRNA dirigés contre une cible donnée ne montrent pas une efficacité d'extinction équivalente. Pour développer cette technologie, il est essentiel d'identifier les éléments liés à la séquence qui sont importants pour la fonctionnalité. Il existe une variété de méthodes pour produire des siRNA, le choix se faisant en fonction du temps disponible et du coût (Boese *et al.*, 2005).

Elbashir et ses collègues ont montré, pour la première fois, le silençage de gènes médié par les siRNA dans les cellules mammaliennes. L'usage de siRNA exogènes de 21 nucléotides s'avère être extrêmement prometteur pour l'étude de fonctions de gènes dans les cellules humaines en culture et le développement de la thérapie génique (Elbashir *et al.*, 2001).

2. Buts du mémoire

Au cours de ces dernières années, plusieurs études sur le rôle des hyaluronidases dans la croissance tumorale et les métastases ont été publiées mais aucun effet général n'est encore discernable. Lors de ce mémoire, notre intérêt se portera vers l'hyaluronidase 2 (HYAL-2) et l'influence que celle-ci pourrait avoir sur certaines propriétés cellulaires des tumeurs. HYAL-2 est une forme d'hyaluronidase à faible activité enzymatique présente à la membrane plasmique et fréquemment exprimée dans les cellules cancéreuses. Selon les études, elle peut agir soit comme oncogène soit comme gène suppresseur tumoral.

Deux types de cellules cancéreuses humaines exprimant HYAL-2 seront étudiés : les cellules MDA-MB231 provenant d'un cancer du sein et les cellules HCT-15 originaires d'un cancer du colon. Ces cellules seront transfectées avec des siRNA dirigés contre *HYAL-2* afin d'en réprimer l'expression et d'étudier *a contrario* les effets liés à la présence de cette protéine.

Dans un premier temps, les conditions de transfection seront affinées en testant différentes formes et quantités de siRNA et d'agent transfectant, la Lipofectamine 2000, pour entraîner une diminution significative de la quantité d'ARNm d'*HYAL-2*.

Une fois ces conditions obtenues, l'influence d'HYAL-2 sur trois propriétés cellulaires, la prolifération, l'apoptose et la motilité, sera étudiée. La prolifération sera caractérisée suite à l'incubation des cellules avec de la thymidine tritiée et à l'incorporation de cette dernière lors de la division des cellules. Des expériences d'immunofluorescence utilisant un anticorps de lapin anti-caspase 3 humaine active nous permettront ensuite de détecter et d'analyser l'apoptose. Pour évaluer la motilité, des lamelles seront recouvertes d'une fine couche d'or colloïdal etensemencées avec les cellules traitées ou non avec des siRNA contre *HYAL-2*. Lors de leur déplacement, les cellules laissent une trace dépourvue de particules d'or ; la surface de cette trace sera mesurée.

Au total, la comparaison de ces trois propriétés fondamentales des cellules cancéreuses (prolifération, apoptose, motilité) suite à une répression de l'expression d'HYAL-2 devrait nous permettre d'apporter de précieux arguments au débat toujours en cours sur le caractère suppresseur ou facilitateur tumoral d'HYAL-2.

3. Matériel et Méthode

3.1. Culture cellulaire

3.1.1. Cellules

Deux types de cellules cancéreuses ont été étudiés au cours de ce mémoire : les cellules MDA-MB231, des fibroblastes de cancer du sein humain et les HCT-15, des cellules épithéliales de cancer du colon humain.

3.1.2. Matériel

- Milieu de culture : RPMI et DMEM (Cambrex)
- Fœtal Bovine Serum (FBS, Cambrex)
- Hepes 1M (Gibco)
- Phosphate buffer saline 1x (PBS) à pH 7,3 :
 - KH_2PO_4 : 1,54 mM
 - Na_2HPO_4 : 2,7 mM
 - NaCl : 154 mM
 - H_2O stérile
- Trypsine-EDTA (diluée dans du PBS) (Cambrex)
- Trypan bleu 0,4%

Les cellules HCT-15 sont cultivées dans du milieu RPMI auquel sont ajoutés 10% de FBS et 20 mM d'Hepes. Les MDA-MB231, quant à elles, sont entretenues avec du milieu DMEM contenant 10 mM d'Hepes et enrichi avec 10% de FBS.

3.1.3. Passage des cellules

- Lorsque les cellules atteignent 70 à 80% de confluence, aspirer le milieu et rincer les cellules avec du PBS préchauffé à 37°C.
- Incuber les cellules en présence de trypsine pendant 5 minutes à 37°C.
- Ajouter au moins un volume de milieu afin de stopper l'action de la trypsine.
- Centrifuger 7 minutes à 1200 rpm à température ambiante et resuspendre le culot cellulaire dans un volume de milieu de culture.
- Prélever un échantillon et y ajouter du bleu de Trypan afin de distinguer les cellules vivantes ; les cellules colorées par le bleu de Trypan étant des cellules mortes.
- Compter les cellules à l'aide d'une cellule de Bürker.
- Réensemencer les cellules à la concentration souhaitée et les incuber à 37°C avec 5% de CO_2 .

3.2. Transfection

3.2.1. Principe

Cette technique permet l'introduction de matériel génétique exogène, ADN ou ARN, au sein de cellules eucaryotes. Au cours de ce mémoire, les transfections ont été réalisées grâce à un lipide cationique, la Lipofectamine 2000. En effet, celle-ci présente de nombreux avantages, parmi lesquels une efficacité de transfection élevée dans de nombreux types cellulaires. De plus, les complexes acides nucléiques-Lipofectamine 2000 peuvent être ajoutés directement au milieu de culture en présence ou non de FBS. Etant donné que la Lipofectamine 2000 et le matériel génétique s'associent pour former des complexes selon un rapport spécifique, les concentrations optimales en Lipofectamine et en siRNA ont été déterminées pour chaque type cellulaire afin d'obtenir l'efficacité de transfection la plus élevée. Ces conditions de transfection seront développées en détails dans la partie résultats.

3.2.2. Matériel

- Un agent transfectant : la Lipofectamine 2000 (Invitrogen)
- Un agent à transférer : les siRNA dirigés contre HYAL-2, 100 μ M (Eurogentec) (voir le tableau 2.1) ou le scramble 100 μ M (Eurogentec, contrôle négatif universel)

3.2.3. Méthode

- Ensemencer les cellules la veille dans une boîte de 6 puits à raison de 500.000 cellules par puits. Les cellules doivent atteindre 30 à 50 % de confluence lors de la transfection.
- Diluer les siRNA dans du milieu sans FBS : pour les HCT-15, diluer 1,5 μ l de siRNA ou de scramble dans 250 μ l et pour les MDA-MB231, diluer 0,5 μ l de siRNA ou de scramble dans 250 μ l. Mélanger doucement.
- Diluer la quantité appropriée de Lipofectamine 2000 dans du milieu sans FBS : pour les deux types cellulaires, diluer 7 μ l de Lipofectamine 2000 dans 250 μ l. Mélanger.
- Incuber 5 minutes à température ambiante.
- Combiner la Lipofectamine et les siRNA et agiter en inversant plusieurs fois le tube.
- Incuber 20 minutes à température ambiante.
- Pendant ce temps, rincer les puits et ajouter 2 ml de milieu avec FBS.
- Déposer le mélange siRNA-Lipofectamine sur les cellules et agiter.
- Placer la boîte dans l'incubateur à 37°C avec 5% de CO₂ pendant 24 à 72 heures.

3.3. Extraction et quantification d'ARN

3.3.1. Principe

Après homogénéisation à l'aide d'une colonne "Qiashredder", l'ARN est extrait des cellules grâce au kit "RNeasy". Il est ensuite quantifié et analysé par RT-PCR. Etant donné que l'ARN est susceptible d'être dégradé et qu'il est sensible à la présence de RNases, il est indispensable de travailler dans des conditions RF (RNase-free).

3.3.2. Matériel

- Colonnes QIA Schredder (Qiagen)
- RNeasy mini kit Qiagen (Qiagen)
- DNase (Qiagen)
- Grattoirs à cellules
- β -mercaptoéthanol
- Ethanol 70% RF
- Spectrophotomètre UV (Pharmacia Gene Quant)

Remarque : les solutions et le matériel utilisés doivent être RF ; l'usage de gants et de tips à filtre RF est indispensable.

3.3.3. Méthode

- Les cellules sont grattées dans la solution de lyse du kit RNeasy à laquelle a été ajouté du β -mercaptoéthanol.
- Ensuite, les cellules sont homogénéisées à l'aide des colonnes "Qiasredder".
- L'ARN est extrait grâce au kit "Rneasy" combiné avec un traitement à la DNase afin d'éliminer l'ADN génomique contaminant selon le protocole fourni avec le kit.
- L'ARN est dosé avec un spectrophotomètre UV en convertissant l'absorbance lue à 260 nm en concentration d'ARN ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Absorbance} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{facteur de dilution}$$

- L'ARN est stocké à -80°C .

3.4. Synthèse d'ADNc à partir d'ARN et PCR (RT-PCR)

3.4.1. Rétro-transcription (RT)

3.4.1.1. Principe

La rétro-transcription de l'ARNm en ADNc est indispensable à l'étape ultérieure d'amplification par PCR. Dans un premier temps, l'ARN est chauffé afin de le dénaturer. Ensuite, l'enzyme reverse transcriptase, les quatre types de nucléotides et les "random hexamers" sont ajoutés afin de synthétiser le brin d'ADN complémentaire à l'ARN.

3.4.1.2. Méthode

- Dans un tube PCR, mettre 2 µg d'ARN dans un total de 6 µl d'H₂O RF.
- Porter 10 minutes à 70°C afin de dénaturer l'ARN, et ensuite déposer l'échantillon sur glace.
- Ajouter le mélange suivant :
 - 4 µl de Tampon M-MLV Reverse Transcriptase (concentré 5x) (Invitrogen)
 - 1 µl de dNTP 10mM
 - 2 µl de DTT 0,1M
 - 1 µl de Random Hexamer (Invitrogen)
 - 1 µl d'enzyme M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen)
 - 5 µl d'H₂O RF
- Agiter et ensuite centrifuger quelques secondes.
- Laisser 5 minutes à température ambiante.
- Mettre 1 heure à 42°C puis 5 minutes à 95°C et, finalement, déposer sur glace.
- Porter le volume à 100 µl avec de l'eau RF.
- Conserver les tubes à -20°C.

3.4.2. PCR

3.4.2.1. Principe

La PCR permet d'amplifier de manière exponentielle un segment particulier d'ADN à partir d'un ADN cible en utilisant des amorces qui s'hybrident de part et d'autre de la séquence. Une des amorces se fixe sur le brin sens alors que l'autre se fixe sur le brin anti-sens.

Afin d'amplifier l'ADN, les deux oligonucléotides, les quatre bases nucléotidiques (dATP, dCTP, dGTP, et dTTP) ainsi que l'ADN polymérase thermorésistante et son tampon sont ajoutés à l'ADN. Ce mélange est soumis à un nombre variable de cycles comprenant trois étapes en vue d'obtenir un nombre important de copies :

- Le matériel de départ de la PCR étant une solution d'ADN bicaténaire, les deux brins doivent être séparés afin de permettre l'hybridation des amorces ; il s'agit de l'étape de dénaturation.
- La température est ensuite diminuée permettant l'hybridation des amorces sur leur séquence homologue. Cette température d'hybridation est spécifique aux amorces et est fonction de la "température de melting" (T_m) calculée pour chaque amorce de la façon suivante :

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = ([\text{nombre de A et T}] \times 2^{\circ}\text{C}) + ([\text{nombre de C et G}] \times 4^{\circ}\text{C})$$

- Au cours de l'étape d'élongation, l'enzyme ajoute des nucléotides à l'extrémité 3' des amorces afin de les allonger. La température de cette étape est fonction de l'enzyme et vaut en général 72°C pour les enzymes classiques. La durée de l'élongation dépend de la longueur du fragment à amplifier.

3.4.2.2. Méthode

- Composition d'un tube de 20 µl :
 - 4 µl de tampon 5x concentré
 - 0,4 µl de dNTP 10 mM chacun
 - 1 µl d'oligonucléotide sens (voir le tableau 2.2)
 - 1 µl d'oligonucléotide anti-sens (voir le tableau 2.2)
 - 0,1 µl d'ADN polymérase Taq GoTaq (Promega)
 - 2 µl d'ADN
 - 11,5 µl d'H₂O
- Le gène d'intérêt est amplifié ainsi que le gène codant pour la *GAPDH* qui sert de contrôle de charge afin de vérifier que la quantité d'ADN de départ est la même dans chaque tube.
- La machine (Perkin Elmer) a été programmée de la manière suivante lors de la réalisation des PCR :

	28x				
94°C	94°C	56°C	72°C	72°C	4°C-15°C
2'	30"	30"	1'	7'	∞

3.5. Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose

3.5.1. Principe

L'électrophorèse sur gel d'agarose est utilisée afin de séparer des acides nucléiques en fonction de leur poids moléculaire. Les échantillons d'ADN, chargés négativement, sont déposés dans des puits proches de la cathode et, sous l'influence d'un champ électrique, ils migrent vers l'anode avec une vitesse spécifique de leur taille. Le gel contient du bromure d'éthidium, un agent s'intercalant dans la double hélice d'ADN qui émet de la fluorescence lors de l'exposition du gel aux UV et permet la visualisation des bandes d'ADN.

3.5.2. Matériel

- Une cuve d'électrophorèse
- Tampon TAE (Tris-acetate EDTA) :
 - Tris 40 mM pH 7,2
 - Acétate de sodium 20 mM
 - EDTA 1 mM
- Bromure d'éthidium 1 mg/ml
- Un marqueur de poids moléculaire : 2-log DNA ladder (New England Biolabs) à 100 ng/µl dans du Tris-EDTA et une solution alourdissante
- Agarose (Bio-RAD)

Remarque: le tampon utilisé lors de la PCR est déjà coloré et alourdissant, les échantillons peuvent donc directement être déposés sur le gel.

3.5.3. Méthode

- Pour un gel 1,5%, dissoudre 1,5 g d'agarose dans 100 ml de tampon TAE en chauffant au four à micro-ondes.
- Ajouter 10 µl de bromure d'éthidium 1 mg/ml.
- Couler le gel dans un moule en plexiglas et placer les peignes.
- Laisser polymériser pendant ¾ h.
- Déposer le gel dans une cuve d'électrophorèse contenant 800 ml de tampon TAE.
- Dans un puits, déposer 10 µl du marqueur de poids moléculaire et, dans les autres puits, déposer 15 µl d'échantillon.
- Laisser migrer les échantillons à 90 V, 400 mA pendant environ 1h.
- A l'aide d'un transilluminateur UV 302 nm, visualiser les bandes et photographier.

3.6. Induction de l'apoptose et immunofluorescence

3.6.1. Principe

L'immunofluorescence permet de détecter et de localiser de manière spécifique un composant cellulaire grâce à une reconnaissance anticorps-antigène et à une émission de fluorescence. La fixation des anticorps primaires sur l'antigène est mise en évidence par des anticorps secondaires dirigés contre les anticorps primaires et couplés à un fluorochrome qui émet de la fluorescence suite à son excitation à une longueur d'onde précise.

Lors de ce mémoire, le but de cette expérience était de détecter la présence d'apoptose suite au traitement des cellules avec un agent pro-apoptotique. Sachant qu'au cours de l'apoptose plusieurs caspases sont activées, l'anticorps primaire utilisé pour déceler l'apoptose est un anticorps anti-caspase 3 active, une caspase effectrice.

3.6.2. Matériel

- Un agent pro-apoptotique.
Au cours de ce mémoire, plusieurs agents ont été testés : la doxorubicine, le paclitaxel, l'étoposide, le cisplatine, le tert-butyl hydroperoxyde, la génistéine et la camptothécine. Leur mécanisme d'action est décrit dans la partie "Résultats et discussion".
- L'anticorps primaire est un anticorps de lapin anti-caspase 3 humaine active (Promega)
- L'anticorps secondaire est un anti-IgG de lapin couplé à un fluorochrome Alexa 488 (Molecular Probes)
- Bovine serum albumin (BSA)
- Paraformaldéhyde (PAF), l'agent fixant
- Triton X100, l'agent perméabilisant les cellules
- TO-PRO-3, un marqueur fluorescent du noyau
- RNase A
- Mowiol, un agent d'enrobage qui préserve aussi la fluorescence contre le "photobleaching"

3.6.3. Méthode

- Déposer une lamelle en verre dans le fond des puits d'une plaque de 6 puits et ensemencer les cellules à raison de 500.000 cellules par puits.
- Le lendemain, transfecter les cellules avec les siRNA ou avec le scramble.
- Après 24 heures, traiter les cellules ou non avec un agent pro-apoptotique pendant une durée déterminée.
- Aspirer le milieu et fixer les cellules avec du PBS contenant 4% de PAF pendant 10 minutes.
- Perméabiliser les cellules durant 5 minutes avec du Triton X100 1% et rincer deux fois 5 minutes avec du PBS.
- Mettre en présence de PBS contenant 3% de BSA pendant 30 minutes.
- Appliquer l'anticorps primaire dilué 100x dans du PBS avec 3% de BSA en chambre humide pendant 2 heures à température ambiante en retournant la lamelle sur une goutte déposée sur du parafilm.
- Laver les cellules 3 fois avec du PBS et 3% de BSA et ajouter l'anticorps secondaire dilué 500x dans la même solution en chambre humide pendant une heure à température ambiante.
- Rincer 3 fois les cellules au PBS.
- Incuber les cellules en présence de TO-PRO-3 en chambre humide pendant 35 minutes afin de visualiser les noyaux. Le TO-PRO-3 est dilué 80x dans du PBS contenant de la RNase A à 2 mg/ml.
- Rincer les cellules 3 fois au PBS et fixer les lamelles sur une lame porte-objet en les retournant sur une goutte de Mowiol préchauffé à 60°C.
- Laisser solidifier une nuit à 4°C.
- Observer au microscope confocal.

3.7. Test de prolifération

3.7.1. Principe

Après la découverte de la nature moléculaire de l'ADN, des précurseurs radioactifs comme la thymidine tritiée (^3H -thymidine) ont été utilisés afin d'évaluer la prolifération cellulaire grâce à l'incorporation de ces précurseurs radioactifs dans l'ADN des cellules qui se multiplient.

3.7.2. Matériel

- Thymidine tritiée (Amersham)
- TCA (Trichloroacetic acid) 10% et 5%
- NaOH 1N
- Solution scintillante LUMASAFE PLUS (Lumac)

3.7.3. Méthode

- Ensemencer les cellules dans une boîte de six puits à raison de 500.000 cellules par puits et laisser les cellules récupérer pendant une nuit.
- Le lendemain, transfecter les cellules avec les siRNA ou avec le scramble.

- Après 24 heures, aspirer le milieu et rincer les cellules.
- Traiter les cellules avec la thymidine tritiée diluée (1 μ Ci/ml) dans du milieu avec FBS et laisser incubé pendant six heures.
- Après six heures, déposer les boîtes de cellules sur la glace, récupérer 100 μ l du milieu et y ajouter 4 ml de solution scintillante afin d'y mesurer la radioactivité en coups par minute (cpm).
- Rincer les cellules deux fois au PBS 1x glacé.
- Ajouter 2 ml de TCA 10% à 4°C pendant une heure pour précipiter les protéines et rincer deux fois avec du TCA 5%.
- Solubiliser les cellules dans 500 μ l de NaOH 1N.
- Ajouter 400 μ l de cette solution à 4 ml de solution scintillante et compter le nombre de coups par minute.
- D'autre part, doser les protéines de manière colorimétrique par le kit BioRad Protein Assay en suivant le protocole fourni. La courbe standard est établie avec des concentrations croissantes de BSA.

3.8. Test de motilité

3.8.1. Principe

Les cellules ensemencées sur des lamelles couvre-objet recouvertes de particules d'or colloïdal migrent et ingèrent les particules d'or colloïdal, laissant une trace dépourvue de particules. La quantification de la migration cellulaire peut être réalisée par des analyses d'images assistées par ordinateur.

3.8.2. Matériel

- Une solution de gélatine 0,5g dans 300ml d'H₂O
- Une solution d'or colloïdal :
 - 11 ml d'eau distillée
 - 6 ml Na₂CO₃ 36,5 mM
 - 1,8 ml AuHCl₄ 14,5 mM
- Formaldéhyde
- Glycergel (Dako)

3.8.3. Méthode

- Ensemencer les cellules dans une boîte de 6 puits à raison de 500.000 cellules par puits.
- Après 24 heures, transfecter les cellules avec les siRNA ou avec le scramble.
- Le lendemain, préparer les lamelles recouvertes d'or colloïdal afin d'y ensemencer les cellules.
- Immerger les lamelles dégraissées à l'éthanol dans la solution de gélatine à 90°C pendant 10 minutes.
- Sécher les lamelles à 70°C pendant 45 minutes, et ensuite les placer dans une plaque 12 puits.

- Porter la solution d'or colloïdal à ébullition et ajouter 1,8 ml de formaldéhyde 0,1%. Les particules d'or se formant, la solution devient brune.
- Ajouter immédiatement environ 1 ml de cette solution chaude sur chaque lamelle couvre-objet et laisser incuber à 37°C pendant 45 minutes.
- Laver trois fois les lamelles avec du PBS afin d'éliminer les particules d'or en excès.
- Placer les lamelles dans une nouvelle plaque de 12 puits et ajouter du milieu de culture.
- Stériliser les lamelles coatées en les exposant aux UV et les rincer avec du milieu de culture.
- Ensemencer les cellules à raison de 2.000 cellules par puits.
- Incuber les cellules pendant 18 heures dans une étuve à 37°C et à 5% de CO₂.
- Fixer les cellules dans du PBS contenant 4% de formaldéhyde pendant 30 minutes.
- Rincer avec du PBS.
- Monter les lamelles sur une lame porte-objet en les retournant sur une goutte de Glycergel et laisser se solidifier pendant 12 heures à température ambiante.
- Observer au microscope à contraste de phase.

4. Résultats et discussion

Introduction

Les expériences réalisées au cours de ce mémoire se focalisent sur les effets que pourrait avoir l'hyaluronidase 2 sur certaines propriétés cellulaires clés comme l'apoptose, la prolifération et la motilité. Deux lignées cellulaires humaines exprimant spontanément *HYAL-2* ont été utilisées : les HCT-15, provenant d'un cancer du colon, et les MDA-MB231, d'un cancer du sein.

Afin d'étudier l'impact d'*HYAL-2* sur ces trois propriétés, les cellules ont été transfectées transitoirement avec des siRNA synthétiques dirigés contre *HYAL-2*. Comme contrôle, les cellules ont été transfectées avec un "scramble", c'est-à-dire un oligonucléotide dont la séquence est aléatoire, afin d'obtenir des conditions expérimentales rigoureusement identiques. Dans un premier temps, les quantités optimales de siRNA et de scramble ainsi que la quantité de Lipofectamine 2000 utilisées lors des transfections ont été déterminées pour chaque type cellulaire en mesurant le niveau d'expression d'*HYAL-2* par RT-PCR. Une fois ces conditions obtenues et une diminution conséquente de la quantité en ARNm d'*HYAL-2* observée, les effets des siRNA, et par conséquent d'*HYAL2* endogène, sur la prolifération, l'apoptose et la motilité ont été étudiés.

4.1. RT-PCR

4.1.1. But de l'expérience

Pour provoquer une diminution d'expression d'*HYAL-2* et étudier ses effets sur le comportement cellulaire, les cellules ont été transfectées avec des siRNA dirigés contre *HYAL-2*. Les conditions optimales de transfection ont été mises au point afin d'obtenir une diminution significative de la quantité d'ARNm d'*HYAL-2*.

4.1.2. Réalisation pratique

Les cellules ont étéensemencées dans une boîte de 6 puits à raison de 500.000 cellules par puits. Le lendemain, les cellules ont été transfectées avec les siRNA dirigés contre *HYAL-2*. Ces siRNA ont été réalisés par Eurogentec sur base de la séquence d'*HYAL-2* et selon leurs programmes de prédiction. Des cellules non transfectées ont, dans un premier temps, servi de contrôle. Dans la suite des expériences, des cellules transfectées avec un scramble ont joué ce rôle. Quarante-huit heures après la transfection, l'ARN a été extrait à l'aide du kit RNeasy (Qiagen) et a ensuite été rétro-transcrit en ADNc afin de réaliser une PCR en utilisant les amorces correspondant au gène à amplifier, *HYAL-2*. La *GAPDH* a également été amplifiée pour s'assurer de la qualité de l'ADNc préparé et pour normaliser les résultats. Un contrôle négatif (ctl⁻), réalisé en remplaçant l'ADNc par de l'eau, nous a permis de détecter une éventuelle contamination dans la PCR. Le contrôle positif (ctl⁺) correspond aux cellules non transfectées ou transfectées avec le scramble selon les cas. Lors des PCR, l'ADNc a été amplifié pendant 28 cycles. Il s'agit du nombre minimal de cycles nous permettant d'observer clairement *HYAL-2* dans les HCT-15 et dans des MDA-MB231 en conditions normales. Nous

évitons ainsi de nous trouver dans la phase plateau de la PCR, ce qui pourrait nous empêcher de visualiser une éventuelle diminution du signal.

L'agent transfectant utilisé lors des expériences est la Lipofectamine 2000. Ce choix a été fait sur base de la littérature et sur base d'essais de transfection réalisés avec la GFP (résultats non montrés).

4.1.3. Résultats

4.1.3.1. MDA-MB231

Les conditions optimales de transfection ont été obtenues en suivant une démarche par étapes. Au départ, trois siRNA dirigés contre *HYAL-2* étaient à notre disposition. Dans un premier temps, les cellules, ensemencées dans une boîte de 6 puits, ont été transfectées avec chaque siRNA à raison de 100 ou de 150 pmol et avec 5 µl de Lipofectamine 2000 par puits afin de déterminer lequel des trois siRNA dirigés contre *HYAL-2* entraînait la diminution la plus importante de l'ARNm d'*HYAL-2*.

Une diminution d'intensité de la bande correspondant à *HYAL-2* suite aux transfections avec les différents siRNA peut être observée par rapport à la situation contrôle (Figure 4.1). L'amplification constante de la *GAPDH* permet de vérifier que la diminution observée pour *HYAL-2* n'est pas due à une mauvaise qualité de l'ADNc.

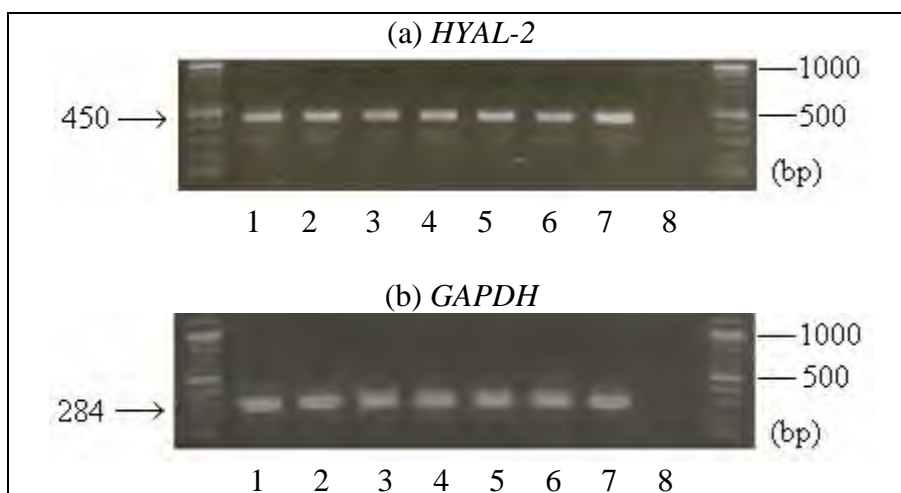


Figure 4.1 : RT-PCR réalisée sur l'ARN soit extrait 48 heures après transfection de MDA-MB231 avec deux quantités différentes de chaque siRNA soit extrait de MDA-MB231 non transfectées.

1 = siRNA n° 1 à 100 pmol par puits ; 2 = siRNA n° 1 à 150 pmol par puits ; 3 = siRNA n° 2 à 100 pmol par puits ; 4 = siRNA n° 2 à 150 pmol par puits ; 5 = siRNA n° 3 à 100 pmol par puits ; 6 = siRNA n° 3 à 150 pmol par puits ; 7 = ctl^+ ; 8 = ctl^-

Sur base de ces résultats, la condition siRNA n° 2 a été choisie car elle semblait engendrer la plus grande diminution de la quantité d'ARNm d'*HYAL-2*. Toutefois, à ce stade, cette décision ne s'appuyait pas sur des mesures quantitatives.

Dans une deuxième étape, les conditions optimales pour la transfection ont été affinées. Les cellules MDA-MB231 ont été transfectées en variant :

- d'une part, la quantité de siRNA choisi : 50, 100, 150, 200 et 250 pmol de siRNA n° 2 par puits en gardant la quantité de Lipofectamine 2000 fixée à 5 μ l (Figure 4.2) ;
- d'autre part, la quantité de Lipofectamine 2000 : 4 à 7 μ l par puits, en gardant une quantité constante de 100 pmol de siRNA n° 2 (Figure 4.2).

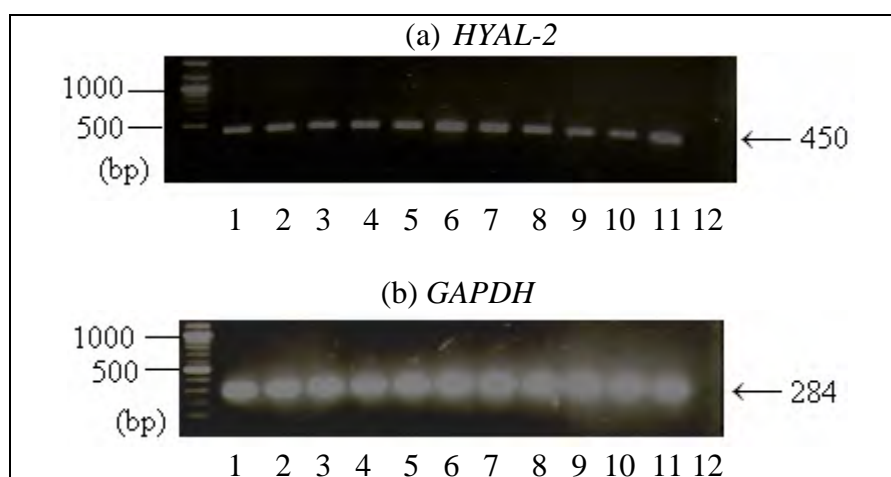


Figure 4.2 : RT-PCR réalisée sur l'ARN soit extrait 48 heures après transfection de MDA-MB231 avec différentes quantités de siRNA n° 2 et différentes quantités de Lipofectamine 2000 soit extrait de MDA-MB231 non transfectées.

1 = siRNA 50 pmol par puits ; 2 = siRNA 100 pmol par puits ; 3 = siRNA 150 pmol par puits ; 4 = siRNA 200 pmol par puits ; 5 = siRNA 250 pmol par puits ; 6 = ctl^+ ; 7 = 4 μ l Lipofectamine par puits ; 8 = 5 μ l Lipofectamine par puits ; 9 = 6 μ l Lipofectamine par puits ; 10 = 7 μ l Lipofectamine par puits ; 11 = ctl^+ ; 12 = ctl^-

Il a été estimé, sur base de ces résultats, que la situation où la quantité de siRNA est de 50 pmol montrait une diminution plus marquée. En ce qui concerne l'agent transfectant, la situation avec 7 μ l de Lipofectamine 2000 nous a semblé présenter la meilleure extinction.

Ayant ainsi déterminé les conditions de transfection optimales en ce qui concerne les quantités de siRNA et d'agent transfectant de manière indépendante (50 pmol de siRNA et 7 μ l de Lipofectamine 2000 par puits), nous avons vérifié que la combinaison de ces deux conditions entraînait effectivement une diminution du taux d'ARNm d'*HYAL-2* (Figure 4.3).

L'extinction n'étant pas spectaculaire, les cellules ont de nouveau été transfectées avec chaque siRNA dirigé contre *HYAL-2* afin de vérifier que, dans les nouvelles conditions mises au point, le siRNA n° 2 semblait toujours le meilleur choix (Figure 4.4).

Le résultat reste mitigé. Dès lors, différents mélanges de siRNA ont également été testés en espérant observer une extinction plus marquée. Les cellules ont été transfectées avec une combinaison des siRNA n° 1 et n° 2, des siRNA n° 2 et n° 3, des siRNA n° 1 et n° 3 et des siRNA n° 1, n° 2 et n° 3, respectivement, à une quantité totale de 50 pmol et avec 7 µl de Lipofectamine 2000 par puits (Figure 4.5).

Il semble que l'utilisation de pools de siRNA permette d'obtenir une extinction plus significative que les siRNA transfectés séparément.

Ne pouvant déterminer sur base de cette photo quelle condition utiliser pour la suite des expériences, nous avons utilisé un logiciel, Scion Image (www.scioncorp.com), afin de déterminer l'intensité du signal de chaque bande de manière plus quantitative. Après avoir mesuré l'intensité dans chaque condition, nous avons normalisé chaque valeur par rapport à la *GAPDH*. Nous avons ainsi pu estimer que la diminution la plus importante était celle correspondant au pool de siRNA n° 2 et n° 3 (Figure 4.6). Bien qu'il ne s'agisse pas d'une RT-PCR quantitative, ces mesures nous permettent un choix plus rationnel.

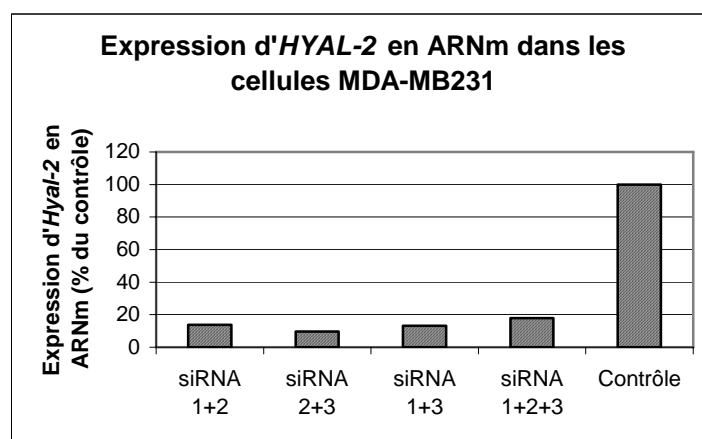


Figure 4.6 : Mesure de l'extinction d'*HYAL-2* grâce au logiciel Scion Image suite à la transfection des MDA-MB231 avec différents pools de siRNA.

Sur base de ces résultats, le pool de siRNA n° 2 et n° 3 a été choisi pour réaliser les expériences fonctionnelles sur le comportement cellulaire.

L'expérience a néanmoins été réalisée une deuxième fois pour confirmation. Lors de cette deuxième expérience, les cellules contrôles ont été transfectées avec le scramble (Figure 4.7). Il s'est avéré que le pool de siRNA n° 2 et n° 3 présentait toujours une diminution importante par rapport aux situations contrôles confirmant ainsi notre choix pour la suite des expériences. Les pools de siRNA n° 1 et n° 2 et siRNA n° 1, n° 2 et n° 3 entraînaient également une diminution conséquente de la quantité d'ARNm d'*HYAL-2*.

L'évolution de l'extinction d'*HYAL-2* au cours du temps après transfection avec le pool de siRNA n° 2 et n° 3 ou avec le scramble a ensuite été mesurée (Figure 4.8). La diminution observée après transfection de siRNA reste pratiquement constante de 24 à 72 heures après transfection, bien qu'on distingue une discrète réaugmentation à 72 heures. Le scramble n'a pas d'effet.

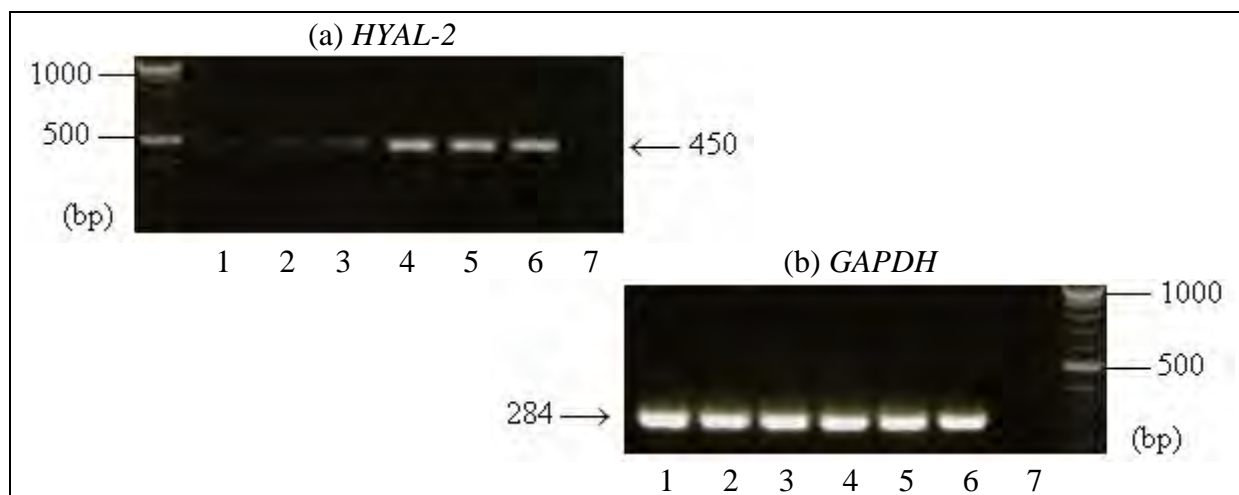


Figure 4.8 : RT-PCR réalisée à partir d'ARN extrait à trois temps différents après transfection de MDA-MB231 soit avec le pool de siRNA n° 2 et n° 3 soit avec le scramble.

1 = siRNA 24 heures ; 2 = siRNA 48 heures ; 3 = siRNA 72 heures ; 4 = *ctl*⁺ 24 heures ;
5 = *ctl*⁺ 48 heures ; 6 = *ctl*⁺ 72 heures ; 7 = *ctl*⁻

4.1.3.2. HCT-15

Tout comme pour les MDA-MB231, la recherche des conditions optimales pour la transfection a été réalisée par étapes. Dans un premier temps, les cellules ont été transfectées avec chaque siRNA dirigé contre *HYAL-2* à 100 et 150 pmol et 5 µl de Lipofectamine 2000 par puits. Suite à l'extraction d'ARN et à la réalisation d'une RT-PCR, il a été déterminé que le siRNA n° 2 présentait une diminution plus marquée de la quantité en ARNm d'*HYAL-2* (Figure 4.9).

Ensuite, les cellules ont été transfectées avec des quantités croissantes de siRNA n° 2 (50 ; 100 ; 150 ; 200 et 250 pmol par puits) et 5 µl de Lipofectamine 2000 par puits (Figure 4.10), puis avec une quantité constante de siRNA n° 2 (150 pmol par puits) et des quantités croissantes de Lipofectamine 2000 (3 µl ; 4 µl ; 5 µl ; 6 µl et 7 µl par puits). Il a été déterminé que les conditions optimales pour réprimer l'expression d'*HYAL-2* étaient 150 pmol de siRNA et 7 µl de Lipofectamine 2000 par puits. Après avoir établi ces conditions, chaque siRNA a été testé (Figure 4.11). Des combinaisons de siRNA dirigés contre *HYAL-2* (siRNA n° 1 et n° 2 ; siRNA n° 2 et n° 3 ; siRNA n° 1 et n° 3 et siRNA n° 1, n° 2 et n° 3) ont également été testées (Figure 4.12).

Ne pouvant distinguer une éventuelle différence sur base des résultats obtenus, nous avons utilisé le logiciel Scion Image afin de mesurer l'intensité de chaque bande (Figure 4.13). Ce programme nous a permis, après avoir normalisé les résultats avec la *GAPDH*, d'estimer que le pool de siRNA n° 1, n° 2 et n° 3 entraînait une plus grande diminution de la quantité d'ARNm d'*HYAL-2*.

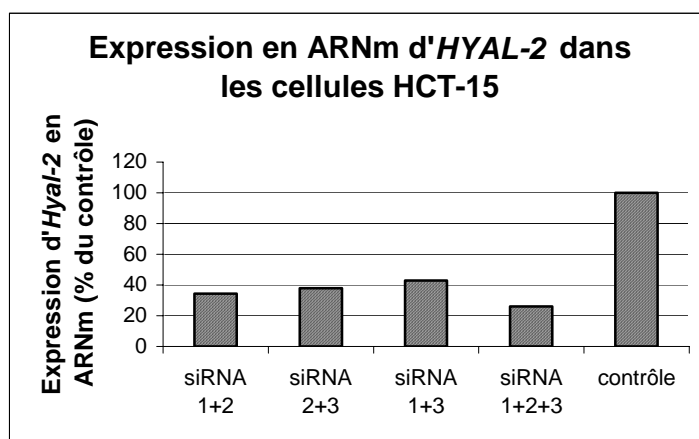


Figure 4.13 : Mesure de l'extinction d'*HYAL-2* grâce au logiciel Scion Image suite à la transfection des HCT-15 avec différents pools de siRNA. Le contrôle correspond à la situation non transfectée.

Pour la suite des expériences de motilité, prolifération et apoptose, les cellules ont donc été transfectées avec le pool de siRNA n° 1, n° 2 et n° 3 à 150 pmol et 7 µl de Lipofectamine 2000 par puits.

Afin de vérifier les résultats obtenus lors de cette dernière RT-PCR, l'expérience a été recommencée selon les conditions déterminées précédemment (150 pmol de siRNA et 7 µl de Lipofectamine 2000 par puits). Les cellules correspondant à la condition contrôle ont été transfectées avec le scramble. Sur base des résultats obtenus, il peut être observé que la condition qui combine les siRNA n° 1, n° 2 et n° 3 présente toujours une forte diminution de la quantité d'ARNm d'*HYAL-2* par rapport aux situations contrôles. Les autres combinaisons semblent également efficaces (Figure 4.14).

Une expérience de cinétique a aussi été réalisée au cours de laquelle les cellules ont été transfectées avec le pool de siRNA n° 1, n° 2 et n° 3 ou avec le scramble. L'ARN a été extrait à 24, 48 et 72 heures après transfection (Figure 4.15). La diminution observée suite à la transfection des cellules se maintient jusque 72 heures.

4.1.4. Interprétation

Ces différentes étapes ont permis d'obtenir des conditions de transfection entraînant une diminution importante de la quantité d'ARNm d'*HYAL-2* pour chaque type cellulaire. Pour les expériences de prolifération, de motilité et d'apoptose, les cellules MBA-MB231 seront transfectées avec le pool de siRNA n° 2 et n° 3 à 50 pmol et 7 µl de Lipofectamine 2000 par puits et les cellules HCT-15, avec la combinaison de siRNA n° 1, n° 2 et n° 3 à 150 pmol et avec 7 µl de Lipofectamine 2000 par puits.

Les méthodes utilisées jusqu'à présent ne permettent pas de quantifier précisément la diminution de l'ARNm d'*HYAL-2* par rapport à la situation contrôle ; pour cela, une PCR quantitative dite "en temps réel" sera nécessaire.

Après avoir étudié l'expression de l'ARNm d'*HYAL-2* par RT-PCR, il serait également intéressant d'étudier la diminution de l'expression protéique d'*HYAL-2* en Western blot suite aux différentes transfections. Nous ne disposons cependant actuellement d'aucun anticorps anti-*HYAL-2* humain qui soit suffisamment efficace.

4.2. La prolifération

4.2.1. But de l'expérience

Le cancer est une maladie caractérisée par la prolifération anarchique de cellules au sein d'un tissu normal de l'organisme. Ces cellules dérivent toutes d'un même clone, cellule initiatrice du cancer qui a acquis certaines caractéristiques lui permettant de se diviser indéfiniment et de former des métastases. Les cellules cancéreuses acquièrent également la capacité d'échapper à l'apoptose. Ces deux propriétés réunies entraînent finalement une évolution rapide des tumeurs.

Le rôle d'*HYAL-2* dans les cancers n'est pas encore clairement défini. Elle pourrait, en effet, agir en tant qu'oncogène ou TSG. Jusqu'à présent, il a été montré que les fragments d'HA qui pourraient être générés par l'action d'*HYAL-2* sont capables, soit de stimuler la prolifération cellulaire, soit d'agir comme suppresseurs de croissance tumorale. Grâce à l'utilisation de siRNA, l'impact réel d'*HYAL-2* sur la prolifération de différents types cellulaires peut maintenant être étudié.

4.2.2. Réalisation pratique

Les cellules ont étéensemencées à raison de 500.000 cellules par puits dans une boîte de 6 puits. Le lendemain, les cellules ont été transfectées selon les conditions établies précédemment, c'est-à-dire, pour les MDA-MB231, 50 pmol du pool de siRNA n° 2 et n° 3 et 7 µl de Lipofectamine 2000 par puits et, pour les HCT-15, 150 pmol du pool de siRNA n° 1, n° 2 et n° 3 et 7 µl de Lipofectamine 2000 par puits. Vingt-quatre heures après transfection, les cellules ont été mises en présence de thymidine tritiée pendant 6 heures puis ont été lysées et l'incorporation de thymidine tritiée y a été mesurée. Un dosage des protéines a également été réalisé afin de normaliser les valeurs obtenues en cpm suite au comptage.

4.2.3. Résultats

4.2.3.1. MDA-MB231

La radioactivité incorporée lors de 6 expériences différentes a été mesurée en duplicats ou en triplicats. Chaque expérience comprend une paire de mesures sur des cellules transfectées soit avec la combinaison de siRNA soit avec le scramble. La moyenne des différentes expériences a été calculée. Il s'est avéré que les différences d'incorporation de thymidine tritiée, d'une expérience à l'autre, étaient importantes, et que le pairage des résultats était justifié. De plus, deux expériences parmi les six effectuées montraient des valeurs environ dix fois plus faibles que les quatre autres (Figure 4.16). L'analyse statistique a tenu compte de cette observation. Dans un premier temps, un test t de Student pairé et bilatéral ("two-tailed") a été réalisé pour les 4 expériences présentant des valeurs élevées. La valeur de p obtenue est de 0.037, ce qui indique une différence significative entre la prolifération des cellules transfectées avec les siRNA et celle des cellules transfectées avec le scramble. La prolifération augmente après réduction de l'expression d'*HYAL-2*. Le test de Student pairé a été répété sur l'ensemble des 6 expériences, aboutissant à un p de 0.022 qui est aussi clairement significatif. Comme la dispersion des valeurs pouvait laisser craindre une répartition non normale, un test non paramétrique (test de Wilcoxon) a aussi été réalisé sur les 6 expériences ; il était également significatif, la valeur de p étant de 0.032.

Les résultats de la mesure de la prolifération exprimée en cpm/ μ g de protéines sont résumés dans le Tableau 4.1. Les cellules transfectées avec les siRNA présentent en moyenne 19,3% de prolifération supplémentaire par rapport aux cellules transfectées avec le scramble. L'intervalle de confiance à 95 % sur la différence va de 4,2 % à 34,5 %, ce qui confirme les résultats du test t de Student et du test non paramétrique et indique que l'augmentation de prolifération est indiscutable tout en restant modérée.

	Scramble	siRNA
Moyenne \pm SEM (cpm/ μ g)	1290 \pm 340	1539 \pm 405
Différence de prolifération	+19,3 %	
Intervalle de confiance à 95 %	+4,2 à +34,5 %	

Tableau 4.1 : Comparaison de la prolifération des MDA-MB231 après transfection avec les siRNA dirigés contre *HYAL-2* ou avec le scramble.

4.2.3.2. HCT-15

Quatre expériences de prolifération ont été réalisées sur les cellules HCT-15, avec mesures en duplicats ou triplicats. La moyenne a été calculée pour chacune des 4 expériences pairées et les résultats sont présentés dans la Figure 4.17. Une analyse statistique utilisant un test t de Student pairé, ainsi qu'une analyse non paramétrique, n'ont pas montré de différence significative entre les deux conditions de transfection, soit avec les siRNA dirigés contre *HYAL-2*, soit avec le scramble.

4.2.4. Interprétation

Ces résultats nous permettent de conclure que l'expression d'*HYAL-2* endogène semble inhiber la prolifération cellulaire de façon modérée mais consistante dans les cellules cancéreuses MDA-MB231 mais pas dans les cellules HCT-15.

Ces observations contredisent les constatations de Udabage et son équipe selon lesquelles les cellules du cancer du sein synthétisent de l'HA de haut PM qui est rapidement endocytosé et dégradé en fragments de 3 à 25 dissacharides capables d'initier de nombreux événements cellulaires dont la migration, la prolifération et la différenciation, le tout sous l'influence d'*HYAL-2* qui interviendrait dans la production de ces fragments (Udabage *et al.*, 2005). Lokeshwar a également montré que les fragments d'HA favorisaient la prolifération, en étudiant celle-ci dans les cellules endothéliales (Lokeshwar *et al.*, 2002).

Cependant, d'autres études ont montré que les fragments d'HA pouvaient avoir des effets anti-prolifératifs, ce qui appuierait les résultats obtenus pour les MDA-MB231. Les oligomères d'HA ont la capacité de supprimer la croissance tumorale ainsi que la formation tumorale *in vivo*. Suite à leur injection sous-cutanée, les oligomères inhiberaient la croissance de mélanomes par compétition avec l'HA de haut PM au niveau du récepteur CD44, ce qui empêcherait l'adhésion nécessaire pour la croissance tumorale et l'invasion. De plus, les oligosaccharides d'HA inhibent la croissance indépendante de l'ancrage de cellules tumorales en supprimant la voie Pi3k/Akt (Stern, 2005).

De façon plus directe, Danilkovitch-Miagkova et son équipe ont montré qu'*HYAL-2* pouvait agir comme un TSG sur la prolifération cellulaire. En effet, l'association entre *HYAL-2* et RON inhibe ce dernier de manière constitutive mais, dans les cellules transformées par Env, *HYAL-2* se lie à la protéine env et libère RON, ce qui conduit à l'activation de ce dernier et des voies de signalisation Akt et MAPK. Ces mécanismes aboutissent, entre autres, à la prolifération (Danilkovitch-Miagkova *et al.*, 2003).

Les expériences réalisées au cours de ce mémoire nous ont permis d'observer que, dans les cellules MDA-MB231, la réduction de l'expression d'*HYAL-2* entraîne une augmentation de la prolifération cellulaire, alors qu'elle n'a pas d'influence sur ce paramètre dans les cellules HCT-15. Etant donné qu'*HYAL-2* est considéré tantôt comme un oncogène, tantôt comme un TSG, il est possible d'observer des effets différents d'*HYAL-2*. Par ailleurs, il ne faut pas oublier que les fragments ou oligomères d'HA utilisés dans de nombreuses expériences ne présentent pas nécessairement les mêmes effets que des fragments générés par *HYAL-2*.

4.3. L'apoptose

4.3.1. Introduction

4.3.1.1. But de l'expérience

L'apoptose est un processus physiologique hautement contrôlé et caractérisé par un programme cellulaire pour l'auto-destruction. Ce programme peut être initié par deux voies : la voie intrinsèque régulée par la famille Bcl-2 et médiée par la mitochondrie et la voie extrinsèque médiée par les récepteurs de mort situés au niveau de la membrane plasmique. En présence de stimulus, ces deux voies amènent à l'activation de caspases qui clivent différents substrats requis dans les cellules non-apoptotiques pour des processus tels que le contrôle du cycle cellulaire, les réparations de l'ADN, la signalisation cellulaire et l'intégrité structurelle. Parmi ces caspases, deux catégories sont distinguées, les caspases initiateuses telles que les caspases 1, 2, 9, 10, etc. et les caspases effectrices comme les caspases 3, 6, 7 et 14.

Au cours de ce mémoire, l'apoptose a été détectée par immunofluorescence. Nous avons utilisé un anticorps primaire dirigé contre un acteur spécifique de l'apoptose, la caspase 3 active. Celle-ci, une fois active, se retrouve sous forme dimérique dans le cytoplasme cellulaire.

Dans un premier temps, ces expériences d'induction d'apoptose et d'immunofluorescence ont été réalisées dans le but d'obtenir un contrôle positif d'apoptose pour chaque type cellulaire. Une fois les conditions établies, l'influence d'HYAL-2 sur l'apoptose a été étudiée suite à la transfection des cellules.

4.3.1.2. Agents pro-apoptotiques

D'un type cellulaire à l'autre, les conditions optimales induisant l'apoptose, telles que la nature, le temps d'incubation et la concentration de l'agent pro-apoptotique, varient. Dès lors, différents agents pro-apoptotiques appartenant à des familles différentes ont été testés sur chaque type cellulaire. Les agents testés sont la doxorubicine, l'étoposide, le paclitaxel, le cisplatine et la camptothécine, des produits anti-cancéreux largement utilisés en clinique, ainsi que la génistéine et le tert-butyl hydroperoxyde.

- La doxorubicine fait partie de la famille des anthracyclines et est classée comme un inhibiteur de la topoisomérase II, bien que d'autres mécanismes d'action ont été caractérisés. Elle est utilisée dans la chimiothérapie de nombreux cancers. Le mécanisme d'apoptose induite par la doxorubicine n'est pas encore clair. Son action anti-cancer principale implique des dommages à l'ADN suite à l'inhibition de la topoisomérase II et la génération de radicaux libres, entraînant l'activation de la caspase 3, et donc l'apoptose (Mizutani *et al.*, 2005). De plus, il a été montré qu'elle induisait l'apoptose dans les cellules ATC en altérant l'état d'acétylation des histones (Rho *et al.*, 2005).
- L'étoposide est un agent anticancéreux largement utilisé et un inhibiteur de la topoisomérase II également. Il induit l'apoptose liée à la production de ROS (reactive oxygen species) mitochondriaux. Il a été montré que l'étoposide pouvait supprimer l'oxydation des cardiolipines catalysée par le cytochrome c à des concentrations

élevées excédant celles requises pour l'induction de l'apoptose. Cependant, cette inhibition de l'oxydation des cardiolipines ne semble pas interférer avec l'exécution du programme apoptotique (Tyurina *et al.*, 2006).

- Le paclitaxel, de la famille des taxanes, est un agent anticancéreux connu pour favoriser l'assemblage des microtubules, inhiber leur dépolymérisation et changer leur dynamique, conduisant à une perturbation de la réorganisation normale du réseau de microtubules requis pour la mitose et la prolifération cellulaire. Les cellules traitées avec le paclitaxel sont incapables d'évoluer normalement dans le cycle cellulaire et sont arrêtées dans les phases G₁ et G₂/M. Le mécanisme de l'apoptose induite par le paclitaxel n'est pas encore bien compris (Park *et al.*, 2004).
- Le cisplatine induit l'apoptose indépendante de la voie du "death receptor" mais dépendante de l'expression de la famille Bcl-2 (Wang *et al.*, 2006). Il génère des ROS dans les cellules de cancer de l'œsophage EC-109 qui causent une modification de la perméabilité membranaire mitochondriale entraînant l'apoptose (Cai *et al.*, 2006).
- La génistéine est un isoflavone dérivé du soja avec des propriétés anti-prolifératives et des activités pro-apoptotiques. Il s'agit d'un agent chimiopréventif potentiel contre plusieurs types de cancers. Le mécanisme pro-apoptotique de la génistéine dans les cellules de cancer du sein (MCF-7) inclut une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire, due à la libération des stocks du réticulum endoplasmique, entraînant l'activation de la caspase 12 (Sergeev I. N., 2004). Dans les cellules de cancer du colon, les HT-29, la génistéine induit l'apoptose par la sur-expression de la protéine pro-apoptotique Bax et l'inhibition de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Yu *et al.*, 2004).
- Le tert-butyl hydroperoxyde (t-BHP) est un composant chimique utilisé pour induire des stress oxydatifs dans les systèmes biologiques. Les mécanismes par lesquels le t-BHP induit l'apoptose ne sont pas encore clairement définis. Il génère des ROS responsables de la peroxydation lipidique et de l'induction d'apoptose. Les changements dans les propriétés de la membrane lipidique mitochondriale entraînent la libération du cytochrome c par la perte de Bcl-2 et le recrutement de Bax (Haidara *et al.*, 2002).
- La camptothécine (CPT) est un alcaloïde toxique isolé d'une plante, la *Camptotheca acuminata*. Elle est utilisée contre les cancers et présente un large spectre d'activité anti-tumorale. La CPT est un inhibiteur de la topoisomérase I qui induit des cassures double brin de l'ADN qui, à leur tour, entraînent l'activation de la machinerie apoptotique via l'activation de caspases (Rodriguez-Hernandez *et al.*, 2006).

4.3.2. Réalisation pratique

Après avoir déposé des lamelles de verre au fond des puits d'une boîte de 6 puits, les cellules ont étéensemencées à raison de 250.000 cellules par puits. Le lendemain, elles ont été transfectées avec les pools de siRNA dirigés contre *HYAL-2* ou avec le scramble et, 24 heures plus tard, elles ont été traitées avec l'agent pro-apoptotique pendant une durée déterminée. Les cellules ont alors été fixées et une immunofluorescence a été réalisée afin de mettre en évidence la caspase 3 activée, témoin de l'entrée en apoptose des cellules.

Afin d'étudier toute liaison non spécifique éventuelle de l'anticorps secondaire lors de l'expérience d'immunofluorescence, des cellules transfectées avec les siRNA ou le scramble traitées ou non avec l'agent pro-apoptotique ont été mises en présence de l'anticorps secondaire sans anticorps primaire.

Dans un premier temps, les différents agents ont été testés sur des cellules non transfectées puis, une fois un agent efficace trouvé, sur des cellules transfectées soit avec les siRNA dirigés contre *HYAL-2* soit avec le scramble.

4.3.3. Résultats

4.3.3.1. MDA-MB231

4.3.3.1.1. Conditions induisant l'apoptose

Du point de vue de l'apoptose, les MDA-MB231 sont très peu caractérisées dans la littérature. Différents agents ont donc été testés. Ces agents et leurs concentrations ont été déterminés sur base de publications étudiant d'autres types cellulaires. Pour certains d'entre eux, la morphologie des cellules a été observée au microscope en transmission puis en immunofluorescence pour la caspase 3 active, pour d'autres seule l'expérience d'immunofluorescence a été réalisée. Lors des expériences de morphologie et d'immunofluorescence sur les cellules MDA-MB231, les cellules ont été traitées avec :

- *L'étoposide*
Les cellules traitées avec cet agent à différentes concentrations (25, 50, 100, 150 et 200 μM) ont été observées au microscope (Figure 4.18). A partir de 100 μM , la cytotoxicité de l'étoposide était forte. Il est probable que les concentrations appliquées étaient trop élevées et que les cellules soient mortes par nécrose. Une expérience d'immunofluorescence a été réalisée avec les concentrations 25 μM et 50 μM , conditions dans lesquelles la majorité des cellules restaient adhérentes. Cependant, il s'est avéré qu'elles avaient énormément souffert suite à leur traitement : elles étaient peu nombreuses et ne présentaient pas ou peu d'apoptose. (Figure 4.19).
- *Le cisplatine*
La morphologie des cellules a été observée après traitement des cellules avec 5 concentrations croissantes de cisplatine (5, 10, 15, 20 et 50 μM). Peu de cellules changeaient de phénotype, quelle que soit la concentration utilisée (Figure 4.18). Aucune expérience d'immunofluorescence n'a été réalisée.
- *Le paclitaxel*
Suite au traitement des cellules avec différentes concentrations (5, 10, 15, 20 et 50 nM), il s'est avéré qu'elles étaient en mauvais état dès la plus faible concentration (Figure 4.18). A 50 nM, il restait peu de cellules. Une expérience d'immunofluorescence a également été réalisée après traitement des cellules avec 5 concentrations différentes de paclitaxel (5, 10, 20, 50 et 100 nM). Pour les trois plus faibles concentrations, des cellules apoptotiques ont été observées mais celles-ci étaient peu nombreuses. Les noyaux des cellules étaient parfois difformes et même fragmentés. Aux concentrations de 50 et 100 nM, il n'y avait pas de cellules

apoptotiques et les noyaux semblaient être plus diffus que les noyaux des cellules contrôles. De plus, les cellules étaient moins nombreuses (Figure 4.19).

- *La doxorubicine*

Suite au traitement des cellules avec différentes concentrations (1, 5, 10, 15 et 20 μM) et à leur observation au microscope, les concentrations de 5 et 10 μM semblaient être les plus appropriées (Figure 4.18). Lors de l'expérience d'immunofluorescence, les cellules ont été traitées avec 0,5 ; 0,75 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4 et 5 μM de doxorubicine mais, dans ces conditions, aucune cellule apoptotique n'a pu être observée. L'expérience a également été réalisée avec des concentrations plus importantes de doxorubicine (10 et 20 μM). A 10 μM , de rares cellules apoptotiques ont été aperçues et à 20 μM , les cellules commençaient à avoir des noyaux difformes, parfois même fragmentés mais aucun signal de caspase 3 active n'a été observé (Figure 4.19).

- *La génistéine*

Les cellules traitées avec cet agent à des concentrations de 25, 50 et 100 μM pendant 48 heures présentaient de l'apoptose pour chaque condition. Cependant, comme 48 heures de traitement est un temps trop long en tenant compte de l'étape de transfection et de la récupération avant le traitement des cellules, nous avons tenté de diminuer le temps d'incubation à 24 heures tout en utilisant des concentrations élevées (25, 50, 100 et 200 μM). Aucune cellule apoptotique n'a été observée dans ces conditions (Figure 4.19). Pour cet agent, les contrôles ont été réalisés avec et sans DMSO.

- *Le tert-butyl hydroperoxide*

Les cellules ont été traitées avec cet agent à une concentration de 50 μM pendant 4 heures, 8 heures et 24 heures. Aucune cellule apoptotique n'a été observée après 4 heures de traitement ; par contre après 8 et 24 heures de traitement, des cellules apoptotiques étaient présentes. A 24 heures, le nombre de cellules total et la proportion de cellules apoptotiques étaient moins importants que pour 8 heures de traitement. Le traitement des cellules pendant 8 heures correspond donc à la meilleure condition (Figure 4.19).

- *La camptothécine*

Suite au traitement des cellules avec trois concentrations (5, 10 et 20 μM) pendant 24 heures, des cellules apoptotiques ont été observées pour chaque condition. La concentration 5 μM permettait un meilleur compromis entre la proportion de cellules en apoptose et le nombre de cellules totales. En effet, à 10 et 20 μM , les cellules étaient moins nombreuses de même que les cellules en apoptose (Figure 4.20).

Les deux derniers agents testés nous ont permis d'observer des cellules apoptotiques. Pour la suite des expériences, le choix de l'agent s'est porté vers la camptothécine étant donné qu'il s'agit d'un agent anticancéreux alors que le t-BHP est un agent chimique. De plus, la camptothécine entraînait un taux plus important de cellules apoptotiques que le paclitaxel.

4.3.3.1.2. Etude de l'influence d'HYAL-2

Avant d'étudier les effets éventuels d'HYAL-2 sur l'apoptose, une expérience d'immunofluorescence a été réalisée sur des cellules transfectées avec le pool de siRNA ou avec le scramble afin de vérifier si la transfection induit de l'apoptose dans les cellules. Les cellules ont étéensemencées à raison de 250.000 cellules par puits dans une boîte de 6 puits. Le lendemain, elles ont été transfectées avec les siRNA ou avec le scramble et 20 heures plus tard, une expérience d'immunofluorescence a été réalisée. Il s'est avéré que l'étape de transfection induisait un faible taux d'apoptose dans les cellules et que celui-ci était similaire dans les cellules transfectées avec le pool de siRNA ou avec le scramble (Figure 4.21).

Pour étudier l'influence d'HYAL-2 sur l'apoptose, les cellules ont été transfectées avec le pool de siRNA ou avec le scramble, puis, 24 heures plus tard, traitées avec la camptothécine à 5 μ M pendant 20 heures, fixées et observées au microscope confocal. Suite à cela, un certain nombre de cellules présentaient un fort signal pour la caspase 3 active au niveau du noyau.

Ce signal présent au niveau du noyau est caractéristique des cellules apoptiques traitées avec la camptothécine. En effet, Rodriguez-Hernandez et ses équipiers ont montré que la camptothécine induisait l'activation de caspases 7 et 3 ainsi que le clivage de PARP (Rodriguez-Hernandez *et al.*, 2006). Ils ont observé que cette activation des caspases 7 et 3 commençait dans le noyau et était détectée avant la fragmentation du noyau. Dans des cellules plus avancées dans l'apoptose, le noyau se fragmentait et les caspases 7 et 3 étaient présentes sous leur forme active dans tous les compartiments cellulaires.

Par contre, Kim et ses équipiers ont montré que la caspase 3, localisée dans le cytoplasme de cellules contrôles, transloquait dans le noyau au moment de son activation. Cette caspase 3 transloquée pourrait jouer un rôle dans l'activation de protéines nucléaires qui accélèrent la fragmentation de l'ADN (Kim *et al.*, 2000). Le signal que nous avons observé au niveau du noyau semble donc spécifique.

Sur base des images obtenues en microscopie confocale, une proportion des cellules apoptotiques a été estimée (voir Figure 4.22). Pour cela, les cellules apoptotiques et non apoptotiques pour les conditions transfectées et traitées avec l'agent ont été comptées sur base du marquage nucléaire au TO-PRO-3.

Lors du comptage, il s'est avéré que le pourcentage de cellules apoptotiques était faible. Il a été estimé que 2,4 % des cellules transfectées avec le scramble et traitées à la camptothécine étaient apoptotiques contre 2,6 % pour les cellules transfectées avec le pool de siRNA et traitées de la même manière. Ce pourcentage de cellules étant trop faible, aucune comparaison fiable ne peut être effectuée.

4.3.3.2. HCT-15

Dans un premier temps, l'objectif était d'obtenir des conditions permettant d'observer des cellules apoptotiques en microscopie confocale. Une fois ces conditions établies, les cellules transfectées ont été traitées avec l'agent pro-apoptotique afin d'étudier l'influence d'HYAL-2 sur l'apoptose.

4.3.3.2.1. Conditions induisant l'apoptose

Dans le but d'induire et d'observer de l'apoptose en microscopie confocale, les HCT-15 ont été traitées avec trois agents pro-apoptotiques pendant 20 heures. Les concentrations utilisées lors de cette première expérience sont basées sur la littérature. Il s'agit de :

- doxorubicine à 0,5 μ M et 1 μ M
- paclitaxel à 50 nM et 100 nM
- étoposide à 25 μ M et 50 μ M

Aux concentrations utilisées, le *paclitaxel* était trop agressif ; les colonies étaient beaucoup plus petites et moins nombreuses que dans les contrôles. Il restait peu de cellules et aucun signal d'apoptose n'a pu être observé. Il est probable que les cellules soient directement mortes par nécrose. Les cellules traitées à l'*étoposide* n'ont pas supporté les concentrations appliquées et sont vraisemblablement mortes par nécrose, aucune cellule n'ayant pu être observée en microscopie confocale suite à ce traitement. Quant aux cellules soumises à la *doxorubicine*, les colonies étaient encore nombreuses et, à la concentration 1 μ M, plusieurs cellules en apoptose ont pu être observées (Figure 4.23).

La doxorubicine semblait donc être un agent approprié pour observer des cellules apoptotiques. Afin d'affiner nos conditions d'apoptose, nous avons testé différentes concentrations. Les cellules ont été traitées avec 0,5 ; 0,75 ; 1 ; 1,25 et 1,5 μ M pendant 20 heures. A la concentration de 0,5 μ M, des colonies comportant des cellules apoptotiques ont pu être observées (Figure 4.24). Plus la concentration augmentait, plus le nombre de cellules apoptotiques croissait jusqu'à la concentration de 1 μ M. Aux concentrations de 1,25 et 1,5 μ M, les colonies étaient moins nombreuses et plus petites et la proportion de cellules en apoptose diminuait. La doxorubicine à 1 μ M pendant 20 heures semblait donc constituer la meilleure condition, permettant un compromis entre le nombre de cellules en apoptose et le nombre de cellules total. Ces conditions ont donc été utilisées pour l'étude de l'influence d'HYAL-2 sur l'apoptose.

4.3.3.2.2. Etude de l'influence d'HYAL-2

Les HCT-15 ont étéensemencées à raison de 250.000 cellules par puits dans une boîte de 6 puits. Après 24 heures, les cellules ont été transfectées avec le pool de siRNA ou avec le scramble et l'expérience d'immunofluorescence a été effectuée 20 heures plus tard. Tout comme pour les cellules MDA-MB231, l'étape de transfection des cellules HCT-15 entraînait un peu d'apoptose, à un taux similaire pour les cellules transfectées avec le pool de siRNA ou avec le scramble (Figure 4.25).

L'influence d'HYAL-2 sur l'apoptose a ensuite été étudiée sur des cellules ensemencées à raison de 250.000 cellules par puits dans une boîte de 6 puits et transfectées avec le pool de siRNA ou avec le scramble. Vingt-quatre heures plus tard, les cellules transfectées ont été traitées avec la doxorubicine à 1 μ M pendant 20 heures. Des cellules apoptotiques ont pu être observées mais aucune différence n'a été perçue entre les cellules traitées et transfectées avec les siRNA ou avec le scramble (Figure 4.26).

Les cellules étant fort isolées et peu nombreuses, l'expérience a été recommencée en ensemencant les cellules à raison de 500.000 cellules par puits. Dans un premier temps, nous avons vérifié si le taux d'apoptose induit par la transfection était influencé par le nombre de cellules. Une expérience d'immunofluorescence a donc été réalisée 20 heures après la transfection sur des cellules transfectées avec le pool de siRNA ou avec le scramble (Figure 4.27). Le taux d'apoptose induit par la transfection elle-même était similaire pour la condition siRNA et pour la condition scramble. Ce taux était supérieur à celui des cellules ensemencées à 250.000 cellules.

Les cellules transfectées avec le scramble et traitées avec la doxorubicine représentent la situation contrôle par rapport à laquelle ont été comparées les cellules transfectées avec les siRNA et traitées avec l'agent pro-apoptotique. Les cellules transfectées avec les siRNA semblaient présenter moins d'apoptose (Figure 4.28). L'expérience a été recommencée, mais cette fois, il ne semblait pas y avoir de différence entre les deux conditions (Figure 4.28).

Afin de mesurer l'apoptose de façon plus quantitative, les différentes images prises en microscopie confocale (5 ou 6 par expérience, prises au hasard) ont été analysées avec le logiciel Scion Image. Nous avons d'abord déterminé un seuil de fluorescence au-dessus duquel une « tache » verte pouvait être considérée comme un dépôt subcellulaire de caspase-3 active (une « particule »), ceci afin de se débarrasser du bruit de fond. Ensuite, le programme a mesuré le nombre de particules ainsi que leur surface individuelle. Pour chaque condition, siRNA et scramble, les surfaces des particules ont été additionnées afin de les comparer. Les surfaces ont été standardisées afin d'être exprimées en valeur relative par μm^2 (Tableau 4.2 et Figure 4.29).

A 250.000 cellules par puits (une seule expérience), aucune différence n'est objectivable entre les cellules transfectées avec les siRNA dirigés contre *HYAL-2* et celles transfectées avec le scramble. A 500.000 cellules par puits (deux expériences séparées), la transfection avec les siRNA montre une apoptose légèrement réduite par rapport à la transfection avec le scramble (d'abord 0,10 vs 0,16, puis 0,08 vs 0,09). Au total cependant, il est difficile de tirer des conclusions sur base de ces expériences limitées. Un test t effectué sur les résultats des 3 expériences ne s'est pas avéré significatif ($p=0.4$).

4.3.4. Interprétation

Pour les HCT-15, les cellules transfectées avec les siRNA dirigés contre *HYAL-2* pourraient présenter moins d'apoptose que les cellules exprimant *HYAL-2*. Cependant, une seule expérience sur trois montre une différence marquée et une confirmation serait absolument nécessaire. Il est possible que la transfection n'ait pas fonctionné avec la même efficacité dans chaque expérience. Pour les MDA-MB231, l'expérience n'a été réalisée qu'une fois et le nombre de cellules apoptotiques était faible.

Ces expériences d'induction de l'apoptose et d'immunofluorescence devraient donc être répétées. Les conditions ne semblaient pas parfaites. En effet, suite au traitement des cellules MDA-MB231 avec la camptothécine sans transfection, la proportion de cellules apoptotiques était très faible. Plusieurs paramètres peuvent être modifiés : le choix de l'agent, sa concentration, la durée du traitement et le nombre de cellules. Il serait donc intéressant d'améliorer les conditions d'induction de l'apoptose afin d'obtenir un nombre plus important de cellules apoptotiques et de pouvoir comparer différentes situations.

Les analyses semi-quantitatives réalisées pour les deux types cellulaires confirment les impressions que nous avons eues lors de l'observation en microscopie confocale. Cependant, il faut tenir en compte qu'un éventuel biais a pu être introduit lors de la prise des images ou encore lors de l'analyse des images. Pour confirmer ces résultats, il est indispensable de réaliser d'autres expériences quantitatives.

Pour les HCT-15, il se pourrait, sur base de ces résultats, qu'HYAL-2 rende les cellules tumorales plus sensibles à l'apoptose. Cette conclusion serait similaire à celle tirée par Chang (Chang, 2002). Il avait en effet remarqué qu'HYAL-2 fonctionnait comme un TSG et pouvait accélérer l'apoptose. Il a également observé que les cellules tumorales sur-exprimaient HYAL-2, augmentant ainsi leur sensibilité à la cytotoxicité du TNF.

Il est à remarquer que les tétrasaccharides, produits prédominants de la digestion d'HA par HYAL-1, sont anti-apoptotiques (Stern, 2005).

4.4. La motilité

4.4.1. But de l'expérience

Les cellules cancéreuses sont caractérisées par un pouvoir invasif élevé. Elles acquièrent la capacité de se détacher de la masse tumorale, de se déplacer, d'envahir les tissus avoisinants et de métastasier à longue distance via la circulation sanguine ou lymphatique.

L'influence d'HYAL-2 sur la motilité reste un domaine peu étudié et peu documenté. Au cours de cette expérience, nous avons voulu étudier l'impact de la diminution d'expression d'HYAL-2 sur la motilité des MDA-MB231 en comparant la surface parcourue par les cellules transfectées avec les siRNA dirigés contre *HYAL-2* et celle parcourue par les cellules transfectées avec le scramble.

4.4.2. Réalisation pratique

Les MDA-MB231 ont étéensemencées dans une boîte de 6 puits à raison de 500.000 cellules par puits. Vingt-quatre heures plus tard, les cellules ont été transfectées avec le scramble ou les siRNA n° 2 et n° 3 à 50 pmol avec 7 µl de Lipofectamine 2000 par puits. Le lendemain, les cellules ont été trypsinisées et réensemencées sur des lamelles couvre-objet recouvertes d'or colloïdal à raison de 2000 cellules par puits dans une boîte de 12 puits. Les boîtes ont été placées dans l'incubateur pendant 18 heures. Les cellules en migrant ingèrent l'or et laissent une trace mesurable dépourvue de particules d'or colloïdal.

Le déplacement des cellules a été étudié à l'aide d'un microscope à contraste de phase. Les surfaces parcourues par les cellules ont été mesurées à l'aide du logiciel Scion Image. Les surfaces obtenues ont ensuite été converties en μm^2 .

4.4.3. Résultats

L'étude de la motilité a été réalisée quatre fois. Les lamelles ont été préalablement recouvertes d'or colloïdal,ensemencées de façon identique et étudiées en triplicats ou duplicats pour les deux conditions (siRNA et scramble). Dans chaque expérience, 60 images ont été analysées pour chaque condition (scramble et siRNA) (Figure 4.30).

Pour ces deux conditions, les moyennes des surfaces mesurées pour chaque lamelle ont été calculées ainsi que la moyenne des différentes expériences (Figure 4.31). Une analyse statistique utilisant un test t de Student non païré a ensuite été réalisée sur les moyennes de chaque lamelle (surfaces parcourues : $3624 \pm 177\mu\text{m}^2$ pour les cellules transfectées avec le scramble et $5071 \pm 351 \mu\text{m}^2$ pour celles transfectées avec les siRNA). Ce test t de Student a révélé que la différence observée était bel et bien significative ($p = 0,0015$).

On peut donc affirmer que la motilité des cellules transfectées avec les siRNA est supérieure de 39,9 % à celle des cellules transfectées avec le scramble. L'intervalle de confiance sur cette différence va de +17,3% à 62,5% (Tableau 4.3).

4.4.4. Interprétation

Les résultats obtenus lors de ces différentes expériences étudiant la motilité des MDA-MB231 ainsi que l'analyse statistique réalisée permettent de conclure qu'HYAL-2 inhibe la motilité dans ce type cellulaire, agissant donc dans le sens d'un TSG.

Ces résultats contredisent les observations réalisées et publiées par plusieurs auteurs.

Tout d'abord, il a été montré que les fragments d'HA générés par les hyaluronidases activent des voies de signalisation agissant sur la motilité et la migration des cellules tumorales. La liaison de l'HA au récepteur CD44 conduit à l'activation de la GTPase Rac1, à une réorganisation du cytosquelette d'actine et à la formation de lamellipodes (Patel *et al.*, 2002). Ensuite, Udagage et ses équipiers ont démontré que, suite à l'endocytose d'HA par les cellules tumorales médiée par le récepteur CD44, la dégradation de l'HA, qui pourrait se faire via HYAL-2, génère de petits fragments d'HA (3 à 25 disaccharides) qui stimulent la migration cellulaire. De plus, les cellules de cancer du sein synthétisent de l'HA de haut PM qui est rapidement dégradé en fragments capables d'initier de nombreux événements cellulaires tels que la migration (Udagage *et al.*, 2005).

Cependant, les résultats obtenus lors de l'étude de l'influence d'HYAL-2 sur la motilité des MDA-MB231 (inhibition) vont dans le même sens que les résultats de prolifération (réduction), situant HYAL-2 comme un TSG plutôt qu'un oncogène. Ces résultats offrent des perspectives très intéressantes.

5. Conclusions et perspectives

Les publications concernant l'hyaluronidase 2 (HYAL-2) et son implication dans les cancers sont assez contradictoires. En effet, cette protéine semble agir tantôt comme un oncogène, tantôt comme un gène suppresseur tumoral (TSG). Elle est souvent surexprimée dans les cellules cancéreuses, aussi bien au sein de tumeurs *in vivo* que dans des lignées cellulaires *in vitro*. Les raisons de cette surexpression ne sont pas connues ; on a évoqué la production de cytokines par les cellules du système immunitaire en réponse au cancer, car des cytokines comme IL-1 et TNF sont capables d'augmenter l'expression d'HYAL-2.

L'objectif de ce mémoire était d'étudier l'influence d'HYAL-2 sur trois propriétés cellulaires caractéristiques des cancers, à savoir la prolifération, l'apoptose et la motilité. Pour cela, nous avons d'abord sélectionné deux types de cellules cancéreuses, les HCT-15, des cellules de cancer du colon, et les MDA-MB231, des cellules de cancer du sein, qui expriment HYAL-2 à un taux supérieur à celui des cellules non-cancéreuses. Ensuite, nous avons utilisé des siRNA, introduits par transfection à la Lipofectamine 2000, pour réduire l'expression d'HYAL-2. L'efficacité de ces siRNA a été soigneusement vérifiée en évaluant par RT-PCR la réduction de l'ARNm d'HYAL-2, par comparaison à une transfection au moyen d'ARN inactif, dit "scramble". Nous avons constaté une inhibition très importante des quantités d'ARNm d'HYAL-2. Chacun des trois siRNA testés, mais encore plus une combinaison de 2 ou 3 siRNA, réduisait la détection de l'ARNm d'HYAL-2.

Suite aux expériences réalisées lors de ce mémoire, et aux résultats préliminaires qu'elles ont produits, certaines conclusions peuvent être tirées.

Pour les MDA-MB231, HYAL-2 semble jouer le rôle d'un TSG pour la prolifération et la motilité. Par contre, pour les HCT-15, HYAL-2 n'influence pas la prolifération. Le degré d'augmentation de la prolifération (+20%, de façon tout à fait consistante) et de la motilité (+40%) observé dans les MDA-MB231 lorsque l'expression d'HYAL-2 y est inhibée ne permet pas de conclure qu'HYAL-2 est responsable d'une inhibition de 20% de prolifération et de 40% de motilité des cellules cancéreuses qui l'expriment. Plusieurs raisons peuvent être évoquées :

- le degré de réduction de l'ARNm d'HYAL-2 n'a pas été mesuré avec précision ;
- cette réduction n'est pas complète ;
- la proportion de cellules transfectées n'est pas connue ;
- et le degré de réduction d'expression de la protéine n'a pas pu être évalué. Le développement d'anticorps anti-HYAL-2 humain est attendu afin de pouvoir évaluer ces éléments à l'échelle protéique.

En ce qui concerne l'apoptose, les résultats sont très préliminaires, la technique utilisée (détection immunofluorescente de la caspase-3 activée) est peu quantitative, et l'interprétation des résultats est délicate. Sur base d'une seule expérience convaincante, HYAL-2 aurait également tendance à agir comme un TSG dans les cellules HCT-15, car il semble augmenter l'apoptose, un mécanisme que les cellules cancéreuses cherchent à éviter. Cette conclusion est indirecte car elle est basée sur la réduction, par le siRNA bloquant l'expression d'HYAL-2, de l'apoptose induite par un agent externe. Comme l'agent inducteur utilisé, la doxorubicine, est un principe actif largement utilisé en chimiothérapie qui agit notamment via l'apoptose, HYAL-2 faciliterait donc l'action de ce type de médicament. Une

stratégie visant à augmenter l'expression d'HYAL-2 pourrait ainsi être envisagée comme adjuvant à certaines chimiothérapies.

Les résultats obtenus au cours de ce mémoire tentent à montrer qu'HYAL-2 se comporte comme un TSG et pas comme un oncogène pour deux types de cellules cancéreuses. Ces observations ne vont pas dans le même sens que la majorité des études réalisées sur les fragments d'HA et leurs effets sur les propriétés cancéreuses. Il faut cependant admettre que les fragments d'HA utilisés jusqu'à présent dans toutes les études *in vitro* et *in vivo* ne proviennent pas d'une digestion de l'HA par HYAL-2 mais qu'ils ont été constitués de façon artificielle ; ils ne présentent probablement pas les mêmes effets que ceux qui seraient générés par HYAL-2. Ce point devra être démontré une fois qu'une forme purifiée d'HYAL-2 sera disponible, ou qu'une cellule exprimant HYAL-2 à l'exclusion de toute autre hyaluronidase pourra être examinée *in vitro*.

La plupart des auteurs s'accordent sur le fait qu'HYAL-2 ne présenterait qu'une faible activité de fragmentation d'HA. On peut supposer que cette protéine possède d'autres activités qui restent peu ou pas étudiées. Par exemple, dans certaines cellules épithéliales, HYAL-2 lierait RON et le maintiendrait au repos (Danilkovitch-Miagkova *et al.*, 2003). RON appartient à une famille de proto-oncogènes à activité tyrosine kinase. Il est possible qu'en liant l'HA, HYAL-2 active des voies de transduction du signal qui inhiberaient la prolifération et la motilité et qui favoriseraient l'apoptose. Cette hypothèse est confortée par le fait que les cellules tumorales surexpriment HYAL-2 tout en présentant des taux élevés de synthèse d'HA et, souvent, une couche péricellulaire d'HA.

Quelles pourraient être les suites de ce travail ?

Tout d'abord, il est nécessaire de quantifier la diminution de l'ARNm d'*HYAL-2* en réponse à la transfection des siRNA. Une PCR en temps réel serait un moyen adéquat. L'efficacité de la transfection, en terme de proportion de cellules transfectées, pourrait aussi être mesurée, par exemple en couplant les siRNA à un fluorochrome.

Une étude de l'expression protéique par Western blot serait également intéressante afin d'étudier si les conditions de transfection utilisées entraînent une diminution significative de la protéine HYAL-2. Toutefois, actuellement, aucun anticorps anti-HYAL-2 humain efficace n'est disponible et cette expérience n'a pu être réalisée.

Parmi les effets potentiellement TSG, l'influence d'HYAL-2 sur l'apoptose devrait continuer à être explorée, en déterminant de meilleures conditions d'apoptose pour les MDA-MB231, et en réalisant des expériences quantitatives de mesure d'apoptose pour les HCT-15 exposées à la doxorubicine. Pour cela, plusieurs types d'expériences sont envisageables. Il est possible d'analyser le clivage de PARP, une enzyme impliquée dans la réparation de l'ADN et qui est un substrat des caspases. L'apoptose peut également être détectée et quantifiée grâce au TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick End Labeling). Cette technique est basée sur l'addition de dUTP à l'extrémité 3'OH des brins fragmentés par les nucléases dans le processus apoptotique. Une autre possibilité est d'étudier la translocation irréversible des phosphatidyl sérines dans la membrane externe grâce aux annexines couplées à un FITC (Fluorescein isothiocyanate conjugate).

Un effet très intéressant d'HYAL-2 sur le comportement cellulaire, qui n'a pas encore été décrit dans la littérature mais est évoqué par le résultat de nos expériences, est un ralentissement de la motilité cellulaire. Cet effet observé via les siRNA sur les cellules MDA-MB231 devrait être confirmé sur les HCT-15. S'il se confirme, il serait intéressant d'en étudier les mécanismes et ensuite d'examiner les effets éventuels d'HYAL-2 sur le pouvoir invasif des cellules cancéreuses. A ce stade, les mécanismes par lesquels HYAL-2 inhiberait la motilité cellulaire sont spéculatifs. Les premières hypothèses sont une production de fragments d'HA qui augmentent la motilité (Toole, 2002 ; Boregowda *et al.*, 2006), une interaction avec RON pour autant que celui-ci soit exprimé dans les cellules en question, ou d'autres interactions avec des voies de signalisation intracellulaires. Les possibilités sont multiples. Quant au pouvoir invasif, il peut être étudié par un test sur « Matrigel ». Il s'agit d'une préparation solubilisée de membrane basale de sarcome murin, riche en protéines de la MEC. Le pouvoir invasif des cellules peut être mesuré en fonction de leur capacité à traverser le Matrigel en présence d'un agent chimio-attractif. La croissance indépendante de l'ancrage, une autre particularité des cellules cancéreuses, pourrait être caractérisée en mettant les cellules en culture dans un milieu de « soft agar » et en analysant les colonies formées d'un point de vue morphologique ou d'une manière quantitative.

Parmi toutes les propriétés des cellules cancéreuses, il serait également intéressant d'étudier la perte d'inhibition de contact. L'inhibition de contact est un phénomène par lequel la division des cellules non cancéreuses est inhibée. Les cellules cancéreuses échappent entre autres à ce mécanisme de contrôle de la division cellulaire, ce qui leur permet de se multiplier de manière incontrôlée et anarchique et d'envahir les tissus.

L'étude de la sénescence pourrait aussi s'avérer utile. En effet, l'arrêt de la réplication associée à la sénescence permet de limiter le nombre de mutations nécessaires à la tumorigenèse, ce qui lui confère un rôle de suppresseur de tumeur. La sénescence peut être mise en évidence en détectant des biomarqueurs comme l'activité β -galactosidase, en étudiant la morphologie des cellules ou en étudiant l'expression de protéines régulant ce processus.

En résumé, les résultats de nos expériences effectuées au moyen de siRNA dirigés contre *HYAL-2* dans deux types de cellules cancéreuses suggèrent que cette protéine joue un rôle de suppresseur tumoral (TSG), via une inhibition de la prolifération et de la motilité, et peut-être par accélération de l'apoptose. Plusieurs de ces résultats restent à confirmer mais ils ouvrent la porte à des hypothèses intéressantes dans le domaine oncologique.

6. Références

- Alberts, B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. & Walter P. Cancer. *In : Molecular biology of the cell*. Garland Science, New York, pp 1313-1362 (2002).
- Bantounas, I., Phylactou, L. A. & Uney, J. B. RNA interference and the use of small interfering RNA to study gene function in mammalian systems. *J Mol Endocrinol* **33**, 545-57 (2004).
- Boese, Q., Reynolds, A., & Marshall, W. S. Basics of siRNA design and chemical synthesis. *In : Gene silencing by RNA Interference, Technology and Application*. Sohail, M. CRC Press, New York, pp 127-145 (2005).
- Boregowda, R. K., Appaiah, H. N., Siddaiah, M., Kumarswamy, S. B., Sunila, S., Kn, T., Mortha, K., Toole, B. & Banerjee, S. D. Expression of Hyaluronan in human tumor progression. *J Carcinog* **5**, 2 (2006).
- Bourguignon, L. Y., Singleton, P. A., Diedrich, F., Stern, R. & Gilad, E. CD44 interaction with Na⁺-H⁺ exchanger (NHE1) creates acidic microenvironments leading to hyaluronidase-2 and cathepsin B activation and breast tumor cell invasion. *J Biol Chem* **279**, 26991-7007 (2004).
- Cai, X. B., Jing, X. B., Hu, H., Chen, S. Z. & Li, Y. H. [The Role of Reactive Oxygen Species in Cisplatin-induced Apoptosis of Esophageal Cancer Cell Line EC-109.]. *Ai Zheng* **25**, 427-31 (2006). (article en chinois)
- Camp, E. R., Liu, W., Fan, F., Yang, A., Somcio, R. & Ellis, L.M. RON, a tyrosine kinase receptor involved in tumor progression and metastasis. *Ann Surg Oncol* **12**, 273-81 (2005).
- Caplen, N.J. Gene silencing by RNA interference and the role of small interfering RNAs. *In : Gene silencing by RNA Interference, Technology and Application*. Sohail, M. CRC Press, New York, pp 1-13 (2005).
- Chang, N. S. Transforming growth factor-beta1 blocks the enhancement of tumor necrosis factor cytotoxicity by hyaluronidase Hyal-2 in L929 fibroblasts. *BMC Cell Biol* **3**, 8 (2002).
- Chow, G. & Knudson, W. Characterization of promoter elements of the human HYAL-2 gene. *J Biol Chem* **280**, 26904-12 (2005).
- Csoka, A. B., Frost, G. I. & Stern, R. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biol* **20**, 499-508 (2001).
- Csoka, A. B., Scherer, S. W. & Stern, R. Expression analysis of six paralogous human hyaluronidase genes clustered on chromosomes 3p21 and 7q31. *Genomics* **60**, 356-61 (1999).

Danilkovitch-Miagkova, A., Duh, F. M., Kuzmin, I., Angeloni, D., Liu, S. L., Miller, A. D. & Lerman, M. I. Hyaluronidase 2 negatively regulates RON receptor tyrosine kinase and mediates transformation of epithelial cells by jaagsiekte sheep retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4580-5 (2003).

DeAngelis, P. L., Papaconstantinou, J. & Weigel, P. H. Isolation of a *Streptococcus pyogenes* gene locus that directs hyaluronan biosynthesis in acapsular mutants and in heterologous bacteria. *J Biol Chem* **268**, 14568-71 (1993). (a)

DeAngelis, P. L., Papaconstantinou, J. & Weigel, P. H. Molecular cloning, identification, and sequence of the hyaluronan synthase gene from group A *Streptococcus pyogenes*. *J Biol Chem* **268**, 19181-4 (1993). (b)

Delpech, B., Girard, N., Bertrand, P., Courel, M.N., Chauzy, C. & Delpech, A. Hyaluronan: fundamental principles and applications in cancer. *J Intern Med* **242**, 41-8 (1997).

Dunlap, K. A., Palmarini, M., Adelson, D. L. & Spencer, T. E. Sheep endogenous betaretroviruses (enJSRVs) and the hyaluronidase 2 (HYAL2) receptor in the ovine uterus and conceptus. *Biol Reprod* **73**, 271-9 (2005).

Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. & Tuschl, T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-8 (2001).

Evan, G. I. & Vousden, K. H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* **411**, 342-8 (2001).

Fiszer-Szafarz, B., Litynska, A. & Zou, L. Human hyaluronidases: electrophoretic multiple forms in somatic tissues and body fluids. Evidence for conserved hyaluronidase potential N-glycosylation sites in different mammalian species. *J Biochem Biophys Methods* **45**, 103-16 (2000).

Fraser, J. R., Laurent, T. C. & Laurent, U. B. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med* **242**, 27-33 (1997).

Ghatak, S., Misra, S. & Toole, B. P. Hyaluronan oligosaccharides inhibit anchorage-independent growth of tumor cells by suppressing the phosphoinositide 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem* **277**, 38013-20 (2002).

Haidara, K., Morel, I., Abalea, V., Gascon Barre, M. & DenizEAU, F. Mechanism of tert-butylhydroperoxide induced apoptosis in rat hepatocytes: involvement of mitochondria and endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* **1542**, 173-85 (2002).

Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70 (2000).

Hascall, V. C. & Laurent T.C. Hyaluronan : Structure and physical properties (1997).
<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/> (mars 2006)

Hollins, A. J., Fox, S.P. & Akhtar, S. Exogenous siRNA delivery : Protocols for optimizing delivery to cells. *In : Gene silencing by RNA Interference, Technology and Application*. Sohail, M. CRC Press, New York, pp 127-145 (2005).

Jardine, L. J. Identification of senescence in cancer cells. *In : Cancer Cell Culture, Methods and Protocols*. Langdon, S.P., Humana Press, Totowa, New Jersey, pp 231-232 (2003).

Ji, L. Nishizaki, M., Gao, B., Burbee, D., Kondo, M., Kamibayashi, C., Xu, K., Yen, N., Atkinson, E. N., Fang, B., Lerman, M. I., Roth, J. A. & Minna, J. D. Expression of several genes in the human chromosome 3p21.3 homozygous deletion region by an adenovirus vector results in tumor suppressor activities in vitro and in vivo. *Cancer Res* **62**, 2715-20 (2002).

Kim, E., Baba, D., Kimura, M., Yamashita M., Kashiwabara, S. & Baba, T. Identification of a hyaluronidase, Hyal5, involved in penetration of mouse sperm through cumulus mass. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18028-33 (2005).

Kim, J. M., Luo, L. & Zirkin, B. R. Caspase-3 activation is required for Leydig cell apoptosis induced by ethane dimethanesulfonate. *Endocrinology* **141**, 1846-53 (2000).

Laurent, T. C. & Fraser, J. R. Hyaluronan. *Faseb J* **6**, 2397-404 (1992).

Laurich, C., Wheeler, M. A., Iida, J., Neudauer, C. L., McCarthy, J. B. & Bullard, K. M.. Hyaluronan mediates adhesion of metastatic colon carcinoma cells. *J Surg Res* **122**, 70-4 (2004).

Lawry, J. Detection of apoptosis by the tunel assay. *In : Cancer Cel Culture, Methods and Protocols*. Langdon, S.P., Humana Press, Totowa, New Jersey, pp 183-184 (2003).

Lee, S. H. & Sinko, P. J. siRNA--getting the message out. *Eur J Pharm Sci* **27**, 401-10 (2006).

Lepperdinger, G., Mullegger, J. & Kreil, G. Hyal2--less active, but more versatile? *Matrix Biol* **20**, 509-14 (2001).

Lepperdinger, G., Strobl, B. & Kreil, G. HYAL2, a human gene expressed in many cells, encodes a lysosomal hyaluronidase with a novel type of specificity. *J Biol Chem* **273**, 22466-70 (1998).

Liu, S. L., Duh, F. M., Lerman, M. I. & Miller, A. D. Role of virus receptor Hyal2 in oncogenic transformation of rodent fibroblasts by sheep betaretrovirus env proteins. *J Virol* **77**, 2850-8 (2003).

Lokeshwar, V. B., Schroeder, G. L., Carey, R. I., Soloway, M. S. & Iida, N. Regulation of hyaluronidase activity by alternative mRNA splicing. *J Biol Chem* **277**, 33654-63 (2002).

McManus, M. T. & Sharp, P. A. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet* **3**, 737-47 (2002).

Meyer, K. & Palmer, J.W. The polysaccharidein vitreous humor. *J Biol Chem* **107**, 629-634 (1934).

- Mizutani, H., Tada-Oikawa, S., Hiraku, Y., Kojima, M. & Kawanishi, S. Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. *Life Sci* **76**, 1439-53 (2005).
- Novak, U., Stylli, S. S., Kaye, A. H. & Lepperdinger, G. Hyaluronidase-2 overexpression accelerates intracerebral but not subcutaneous tumor formation of murine astrocytoma cells. *Cancer Res* **59**, 6246-50 (1999).
- Park, S. J., Wu, C. H., Gordon, J. D., Zhong, X., Emami, A. & Safa, A. R.. Taxol induces caspase-10-dependent apoptosis. *J Biol Chem* **279**, 51057-67 (2004).
- Patel, S. Turner, P. R., Stubberfield, C., Barry, E., Rohlf, C.R., Stamps, A., Tyson, K., Terrett, J., Box, G., Eccles, S. & Page, M. J. Hyaluronidase gene profiling and role of hyal-1 overexpression in an orthotopic model of prostate cancer. *Int J Cancer* **97**, 416-24 (2002).
- Prehm, P. Synthesis of hyaluronate in differentiated teratocarcinoma cells. Mechanism of chain growth. *Biochem J* **211**, 191-8 (1983).
- Rai, S. K., DeMartini, J. C. & Miller, A. D. Retrovirus vectors bearing jaagsiekte sheep retrovirus Env transduce human cells by using a new receptor localized to chromosome 3p21.3. *J Virol* **74**, 4698-704 (2000).
- Rai, S. K., Duh, F.-M., Vigdorovich, V., Danilkovitch-Miagkova, A., Lerman, M. I. & Miller, D. Candidate tumor suppressor HYAL2 is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored cell-surface receptor for jaagsiekte sheep retrovirus, the envelope protein of which mediates oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4443-8 (2001).
- Rho, J. H., Kang, D. Y., Park, K. J., Choi, H. J., Lee, H. S., Yee, S. B. & Yoo, Y. H. Doxorubicin induces apoptosis with profile of large-scale DNA fragmentation and without DNA ladder in anaplastic thyroid carcinoma cells via histone hyperacetylation. *Int J Oncol* **27**, 465-71 (2005).
- Rodriguez-Hernandez, A., Brea-Calvo, G., Fernandez-Ayala, D. J. M., Cordero, M., Navas, P. & Sanchez-Alcazar, J. A. Nuclear caspase-3 and capase-7 activation, and Poly(ADP-ribose) polymerase cleavage are early events in camptothecin-induced apoptosis. *Apoptosis* **11**, 131-9 (2006).
- Scott, J.E. Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution. Some biological consequences (1998).
<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/> (mars 2006)
- Scott, W.N., Angiogenesis Assays. *In : CancerCell Culture, Methods ans Protocols*. Langdon, S.P., Humana Press, Totowa, New Jersey, pp 239-241 (2003). (a)
- Scott, W.N., Invasion and motility assays. *In : CancerCell Culture, Methods ans Protocols*. Langdon, S.P., Humana Press, Totowa, New Jersey, pp 225-229 (2003). (b)
- Sergeev, I. N. Genistein induces Ca²⁺ -mediated, calpain/caspase-12-dependent apoptosis in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **321**, 462-7 (2004).

Spicer, A. P. & McDonald, J. A. Characterization and molecular evolution of a vertebrate hyaluronan synthase gene family. *J Biol Chem* **273**, 1923-32 (1998). (a)

Spicer, A.P. & McDonald, J.A. Eukaryotic hyaluronan synthases (1998). (b)
<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/> (mars 2006)

Stern, R. Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? *Glycobiology* **13**, 105R-115R (2003).

Stern, R. Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. *Eur J Cell Biol* **83**, 317-25 (2004). (a)

Stern, R. Update on the mammalian hyaluronidases (2004).
<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/> (mars 2006) (b)

Stern, R. Hyaluronan metabolism: a major paradox in cancer biology. *Pathol Biol (Paris)* **53**, 372-82 (2005).

Stern, R. & Csoka, A.B. Mammalian hyaluronidases (2000).
<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/> (mars 2006)

Toole, B. P. Hyaluronan promotes the malignant phenotype. *Glycobiology* **12**, 37R-42R (2002).

Tyurina, Y., Kini, V., Tyurin, V., Vlasova, I., Jiang, J., Kapralov, A., Belikova, N., Yalowich, J., Kurnikov, I. & Kagan, V. Mechanisms of cardiolipin oxidation by cytochrome c: relevance to pro- and anti-apoptotic functions of etoposide. *Mol Pharmacol* (2006).

Uchiyama, H., Dobashi, Y., Ohkouchi, K. & Nagasawa, K. Chemical change involved in the oxidative reductive depolymerization of hyaluronic acid. *J Biol Chem* **265**, 7753-9 (1990).

Udabage, L., Brownlee, G. R., Nilsson, S. K. & Brown, T. J. The over-expression of HAS2, Hyal-2 and CD44 is implicated in the invasiveness of breast cancer. *Exp Cell Res* **310**, 205-17 (2005).

Wang, P., Song, J. H., Song, D. K., Zhang, J. & Hao, C. Role of death receptor and mitochondrial pathways in conventional chemotherapy drug induction of apoptosis. *Cell Signal* (2006).

Weigel, P. H., Hascall, V. C. & Tammi, M. Hyaluronan synthases. *J Biol Chem* **272**, 13997-4000 (1997).

Weissmann, B. & Meyer, K. The structure of hyalobiuronic acid and of hyaluronic acid from umbilical cord. *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 1753-1757 (1954).

Weinberg, R. A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**, 323-30 (1995).

Yu, Z., Li, W. & Liu, F. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by genistein in colon cancer HT-29 cells. *Cancer Lett* **215**, 159-66 (2004).

Table des matières

1.	Introduction	1
1.1.	L'acide hyaluronique.....	1
1.1.1.	Structure et localisation.....	1
1.1.2.	Fonctions	2
1.1.3.	Synthèse de l'acide hyaluronique.....	3
1.1.3.1.	Les hyaluronan synthases.....	3
1.1.3.2.	Mécanisme de synthèse.....	4
1.1.4.	La dégradation de l'acide hyaluronique	4
1.1.4.1.	Dégradation enzymatique : les hyaluronidases	4
1.1.4.1.1.	Classification.....	4
1.1.4.1.2.	L'hyaluronidase 1 (HYAL-1).....	6
1.1.4.1.3.	L'hyaluronidase 2 (HYAL-2).....	6
1.1.4.1.4.	L'hyaluronidase 3 (HYAL-3).....	7
1.1.4.1.5.	L'hyaluronidase 4 (HYAL-4).....	7
1.1.4.1.6.	PH-20	7
1.1.4.1.7.	L'hyaluronidase 5 (HYAL-5).....	7
1.1.4.1.8.	HYAL-P1	8
1.1.4.2.	L'hyaluronidase 2.....	8
1.1.4.2.1.	Distribution tissulaire et localisation subcellulaire	8
1.1.4.2.2.	Structure génomique et régulation	8
1.1.4.2.3.	Fonctions	9
1.1.4.3.	Dégradation non enzymatique de l'HA.....	10
1.1.4.4.	Cycle catabolique	10
1.1.5.	L'hyaluronasome.....	11
1.2.	Les cancers	11
1.2.1.	Caractéristiques des cancers.....	11
1.2.1.1.	Capacité acquise : autosuffisance des signaux de croissance	12
1.2.1.2.	Capacité acquise : insensibilité aux signaux anti-croissance	12
1.2.1.3.	Capacité acquise : éviter l'apoptose	12
1.2.1.4.	Capacité acquise : potentiel réplcatif moins limité	13
1.2.1.5.	Capacité acquise : angiogénèse soutenue.....	14
1.2.1.6.	Capacité acquise : invasion tissulaire et métastases.....	14
1.2.2.	L'acide hyaluronique dans les cancers.....	15
1.2.3.	Les hyaluronidases dans les cancers	16
1.2.3.1.	L'hyaluronidase 2, un pro-cancéreux.....	16
1.2.3.2.	L'hyaluronidase 2, un suppresseur tumoral	16
1.3.	La RNA interférence	18
2.	Buts du mémoire	20
3.	Matériel et Méthode	21
3.1.	Culture cellulaire	21
3.1.1.	Cellules.....	21
3.1.2.	Matériel	21
3.1.3.	Passage des cellules.....	21
3.2.	Transfection.....	22
3.2.1.	Principe.....	22
3.2.2.	Matériel	22

3.2.3.	Méthode.....	22
3.3.	Extraction et quantification d'ARN	22
3.3.1.	Principe.....	22
3.3.2.	Matériel	23
3.3.3.	Méthode.....	23
3.4.	Synthèse d'ADNc à partir d'ARN et PCR (RT-PCR)	23
3.4.1.	Rétro-transcription (RT).....	23
3.4.1.1.	Principe.....	23
3.4.1.2.	Méthode.....	24
3.4.2.	PCR	24
3.4.2.1.	Principe.....	24
3.4.2.2.	Méthode.....	25
3.5.	Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose.....	25
3.5.1.	Principe.....	25
3.5.2.	Matériel	25
3.5.3.	Méthode.....	26
3.6.	Induction de l'apoptose et immunofluorescence.....	26
3.6.1.	Principe.....	26
3.6.2.	Matériel	26
3.6.3.	Méthode.....	27
3.7.	Test de prolifération	27
3.7.1.	Principe.....	27
3.7.2.	Matériel	27
3.7.3.	Méthode.....	27
3.8.	Test de motilité.....	28
3.8.1.	Principe.....	28
3.8.2.	Matériel	28
3.8.3.	Méthode.....	28
4.	Résultats et discussion.....	30
4.1.	RT-PCR	30
4.1.1.	But de l'expérience.....	30
4.1.2.	Réalisation pratique.....	30
4.1.3.	Résultats	31
4.1.3.1.	MDA-MB231	31
4.1.3.2.	HCT-15.....	34
4.1.4.	Interprétation	36
4.2.	La prolifération.....	36
4.2.1.	But de l'expérience.....	36
4.2.2.	Réalisation pratique.....	36
4.2.3.	Résultats	37
4.2.3.1.	MDA-MB231	37
4.2.3.2.	HCT-15.....	38
4.2.4.	Interprétation	38
4.3.	L'apoptose	39
4.3.1.	Introduction	39
4.3.1.1.	But de l'expérience.....	39
4.3.1.2.	Agents pro-apoptotiques	39
4.3.2.	Réalisation pratique.....	40
4.3.3.	Résultats	41
4.3.3.1.	MDA-MB231	41

4.3.3.1.1.	Conditions induisant l'apoptose	41
4.3.3.1.2.	Etude de l'influence d'HYAL-2.....	43
4.3.3.2.	HCT-15.....	44
4.3.3.2.1.	Conditions induisant l'apoptose	44
4.3.3.2.2.	Etude de l'influence d'HYAL-2.....	44
4.3.4.	Interprétation	45
4.4.	La motilité	46
4.4.1.	But de l'expérience.....	46
4.4.2.	Réalisation pratique.....	46
4.4.3.	Résultats	47
4.4.4.	Interprétation	47
5.	Conclusions et perspectives	48
6.	Références	51

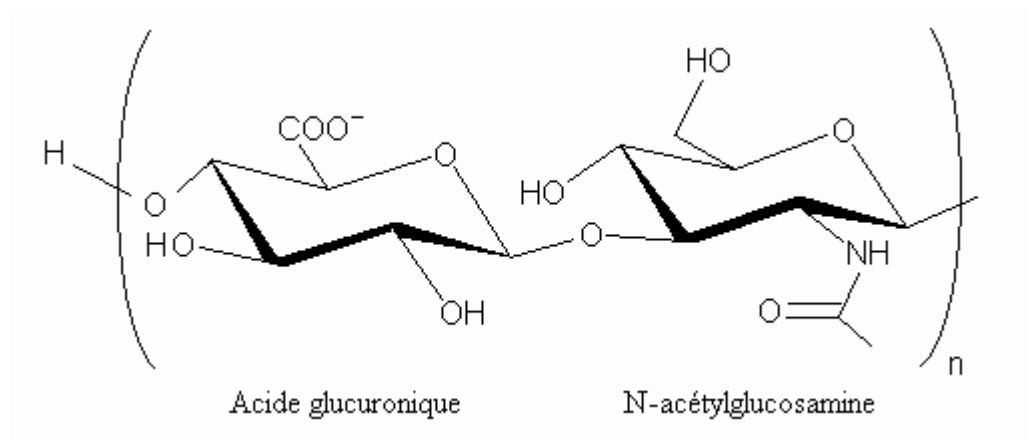


Figure 1.1 : Structure de l'acide hyaluronique.

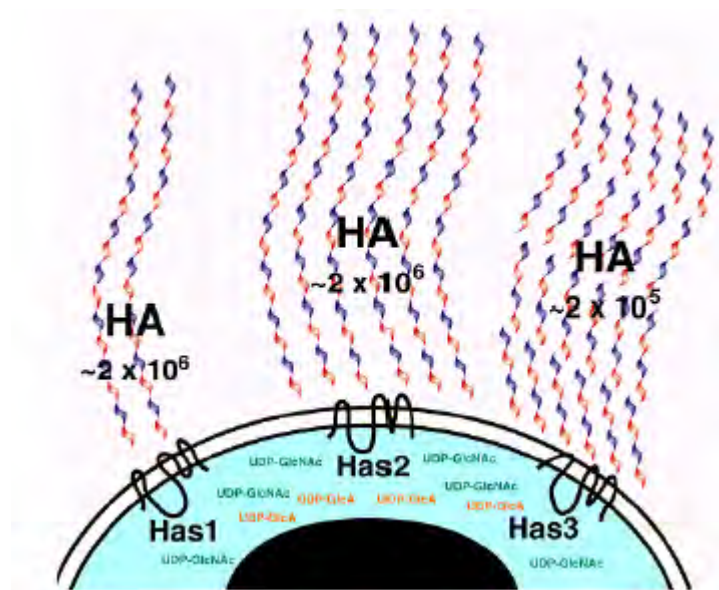


Figure 1.2 : Régulation de la quantité d'HA et de la longueur des chaînes par expression d'une HA-synthase (HAS) spécifique (Has1, Has2 ou Has3) (d'après Spicer and McDonald, 1998).

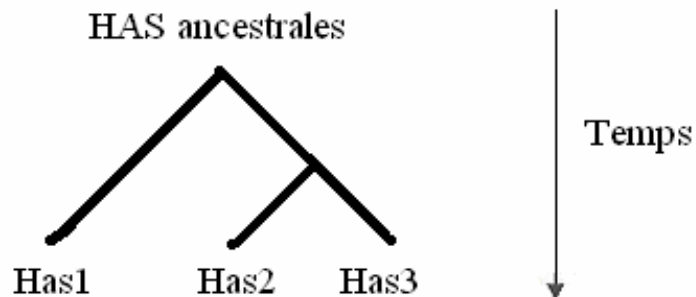


Figure 1.3 : Une première duplication génique a séparé *Has1* de *Has2* et *Has3* suivie d'une deuxième duplication génique ayant séparé *Has2* de *Has3*.

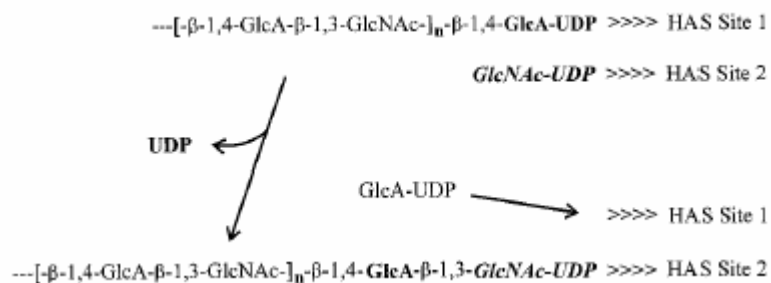
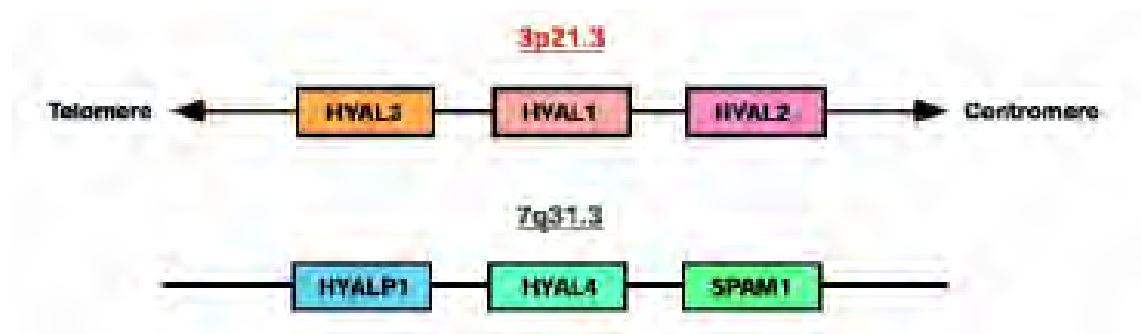


Figure 1.4 : Mécanisme de synthèse de l'HA.
Le disaccharide est synthétisé par extension du polymère à l'extrémité réductrice via un mécanisme à deux sites.



	Gène	Protéine
3p21.3	<i>HYAL-1</i>	HYAL-1
	<i>HYAL-2</i>	HYAL-2
	<i>HYAL-3</i>	HYAL-3
7q31.3	<i>HYAL-4</i>	HYAL-4
	<i>SPAM1</i>	PH-20
	<i>HYAL-P1</i>	aucune

Figure 1.5 : Les six gènes *HYAL* regroupés sur deux régions chromosomiques différentes.

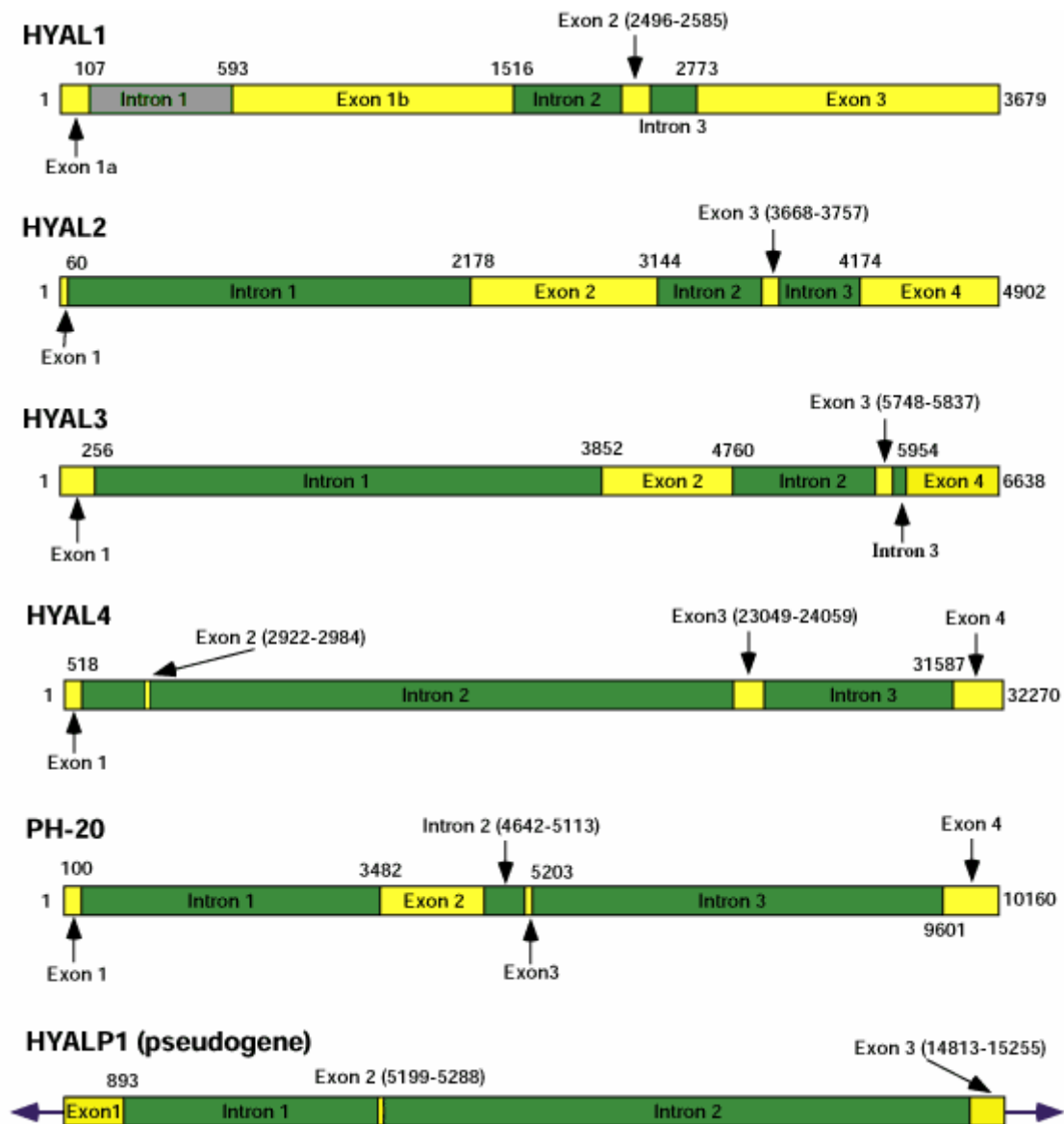


Figure 1.6 : Structures géniques des six hyaluronidases (d'après Stern and Csoka, 2000). La taille relative des introns et exons de chaque gène est respectée mais les gènes ne sont pas représentés à l'échelle. L'intron 1 peut ne pas être épissé, engendrant un seul exon formé de l'exon 1a, de l'intron 1 et de l'exon 1 b. Mais cet ARNm n'est pas traduit en raison de la présence de codons stop au sein de l'intron conservé.

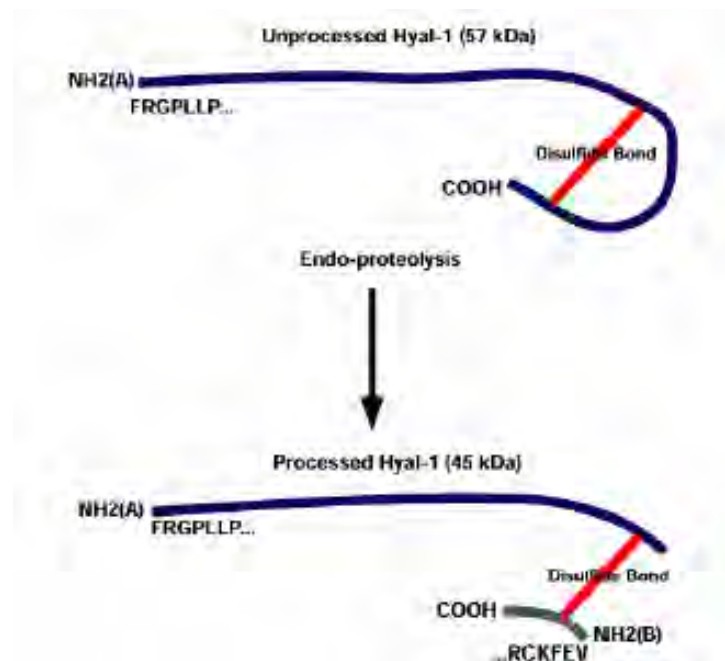


Figure 1.7 : Représentation du traitement endoprotéolytique de l'HYAL-1. Suite au clivage endoprotéolytique, deux fragments sont générés ; le fragment de 22 acides aminés est lié au reste de la protéine par un pont disulfure.

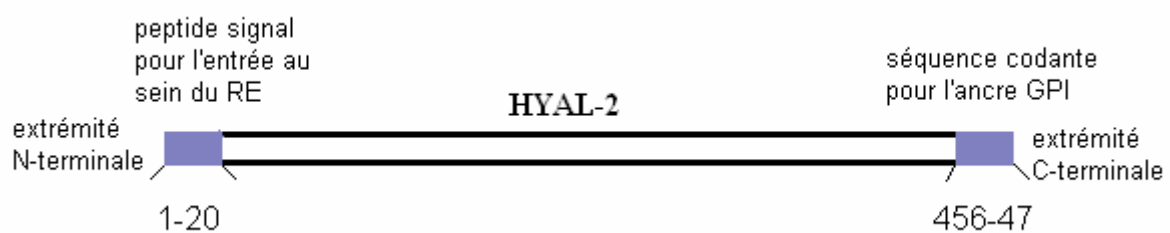


Figure 1.8 : Structure générale d'HYAL-2.

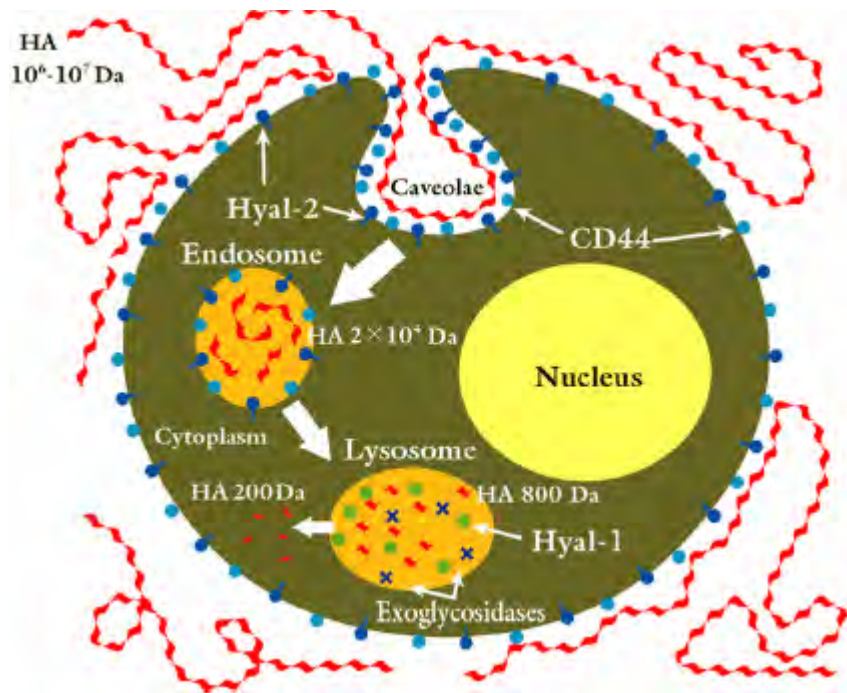


Figure 1.9 : Diagramme du schéma métabolique de la dégradation de l'HA, d'après Stern (2004 (a) et (b)).

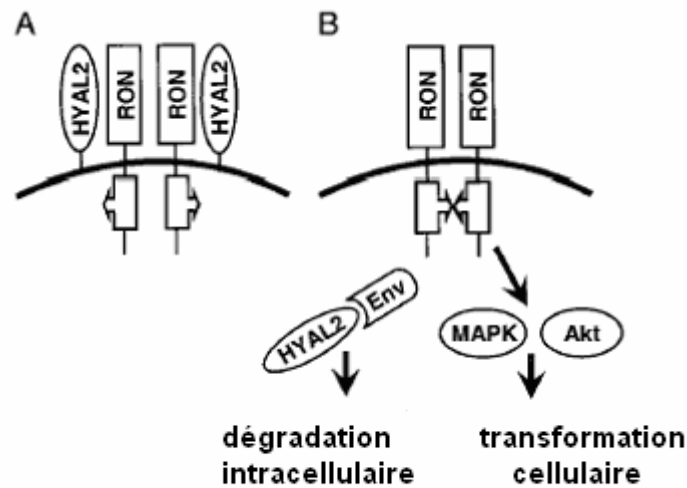


Figure 1.10 : Modèle de transformation de cellules bronchiolo-épithéliales par la protéine Env de JSRV. La situation en l'absence de Env est représentée en A, où HYAL-2 lie RON et inhibe son activité, alors qu'en B, Env est présent et s'associe à HYAL-2, laissant RON libre et actif (d'après Danilkovitch-Miagkova *et al.*, 2003).

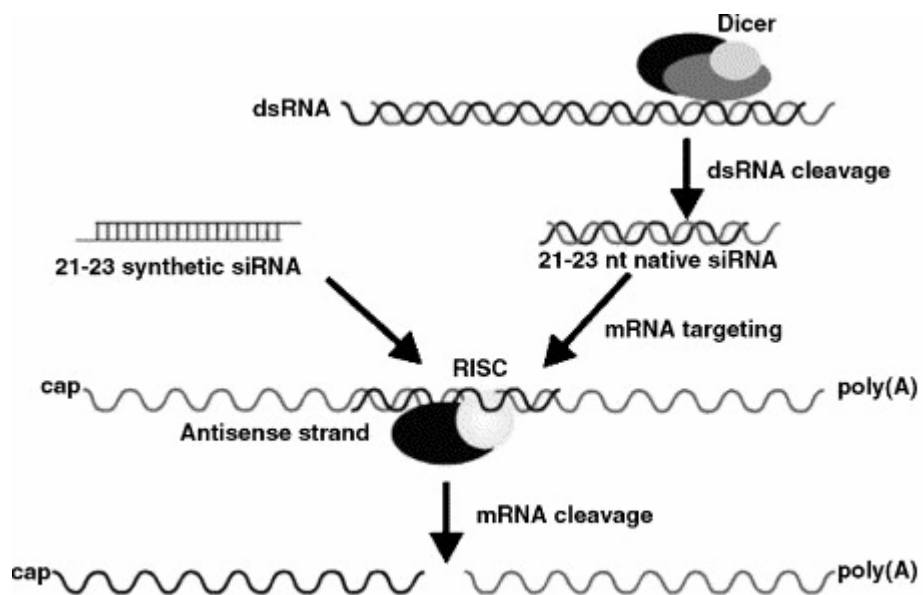


Figure 1.11 : Principe de la RNAi (d'après Lee and Sinko, 2006).

siRNA	<i>Séquence</i>
<i>HYAL-2</i> n° 1 sens	5'-CUG-CUA-CAA-UCA-UGA-UUA-UdTdT-3'
<i>HYAL-2</i> n° 1 anti-sens	5'-AUA-AUC-AUG-AUU-GUA-GCA-GdTdT-3'
<i>HYAL-2</i> n° 2 sens	5'-CUC-CCA-GUC-UAC-GUC-UUC-AdTdT-3'
<i>HYAL-2</i> n° 2 anti-sens	5'-UGA-AGA-CGU-AGA-CUG-GGA-GdTdT-3'
<i>HYAL-2</i> n° 3 sens	5'-GAU-GUG-UAU-CGC-CGG-UUA-UdTdT-3'
<i>HYAL-2</i> n° 3 anti-sens	5'-AUA-ACC-GGC-GAU-ACA-CAU-CdTdT-3'

Tableau 2.1 : Liste des siRNA utilisés au cours de ce mémoire.

Amorces	Séquence	Taille du fragment
<i>GAPDH</i> sens	5'-CCC-ATC-ACC-ATC-TTC-CAG-GAG-3'	284 bp
<i>GAPDH</i> anti-sens	5'-GTT-GTC-ATG-GAT-GAC-CTT-GGC-3'	
<i>HYAL-2</i> sens	5'-GAG-TTC-GCA-GCA-CAG-CAG-TTC-3'	450 bp
<i>HYAL-2</i> anti-sens	5'-CAC-CCC-AGA-GGA-TGA-CAC-CAG-3'	

Tableau 2.2 : Liste des oligonucléotides utilisés pour les PCR.

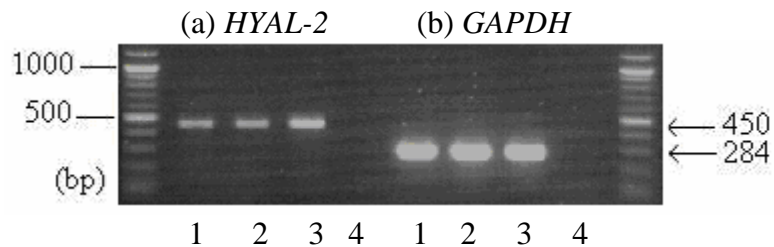


Figure 4.3 : RT-PCR réalisée sur l'ARN soit extrait 48 heures après transfection de MDA-MB231 avec 50 pmol de siRNA n°2 et 7 µl de Lipofectamine 2000 par puits soit extrait de MDA-MB231 non transfectées.

1 = siRNA n° 2 ; 2 = siRNA n° 2 ; 3 = ctl⁺ ; 4 = ctl⁻

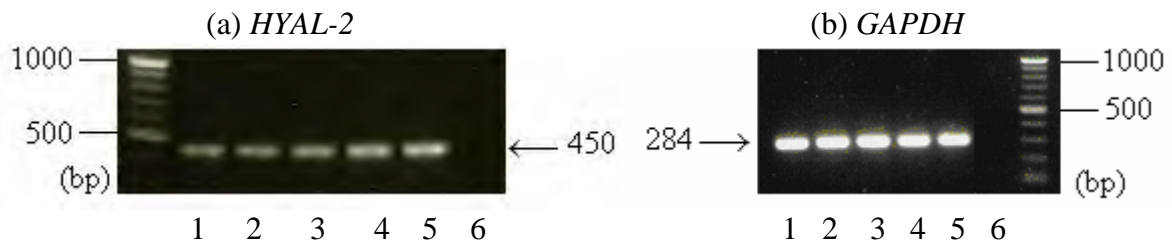


Figure 4.4 : RT-PCR réalisée sur l'ARN soit extrait 48 heures après transfection de MDA-MB231 avec 50 pmol de siRNA et 7 µl de Lipofectamine 2000 par puits soit extrait de MDA-MB231 non transfectées.

1 = siRNA n° 1 ; 2 = siRNA n° 2 ; 3 = siRNA n° 3 ; 4 = ctl⁺ ; 5 = ctl⁺ ; 6 = ctl⁻

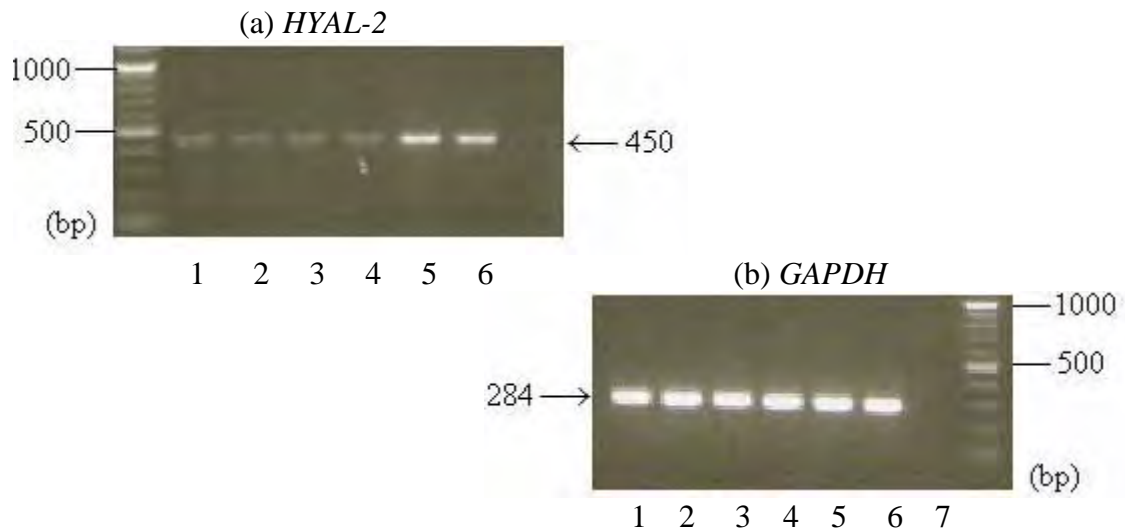


Figure 4.5 : RT-PCR réalisée sur l'ARN soit extrait 48 heures après transfection de MDA-MB231 avec des combinaisons de siRNA soit extrait de MDA-MB231 non transfectées.

1 = siRNA n° 1 et n° 2 ; 2 = siRNA n° 2 et n° 3 ; 3 = siRNA n° 1 et n° 3 ; 4 = siRNA n° 1, n° 2 et n° 3 ; 5 = ctl⁺ ; 6 = ctl⁺ ; 7 = ctl⁻

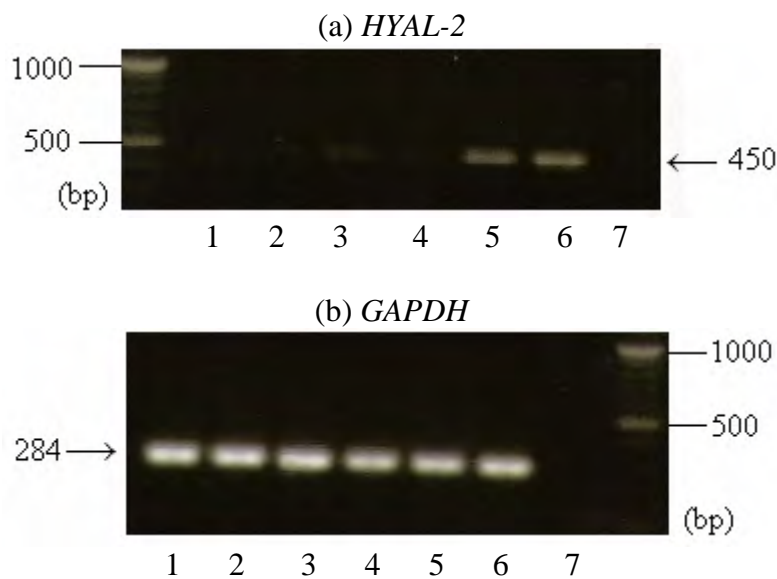


Figure 4.7 : RT-PCR réalisée sur l'ARN extrait 48 heures après la transfection de MDA-MB231, soit avec différentes combinaisons de siRNA à 50 pmol et 7 µl de Lipofectamine 2000, soit avec le scramble.

1 = siRNA n° 1 et n° 2 ; 2 = siRNA n° 2 et n° 3 ; 3 = siRNA n° 1 et n° 3 ; 4 = siRNA n° 1, n° 2 et n° 3 ; 5 = ctl⁺ ; 6 = ctl⁺ ; 7 = ctl⁻

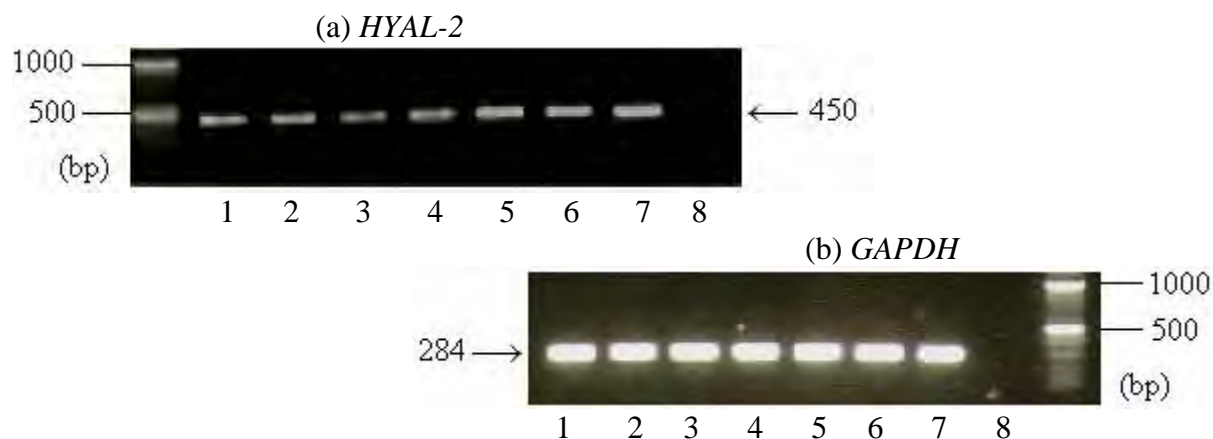


Figure 4.9 : RT-PCR réalisée sur l'ARN soit extrait 48 heures après transfection des HCT-15 avec deux quantités de chaque siRNA soit extrait de HCT-15 non transfectées.
 1 = siRNA n° 1 à 100 pmol par puits ; 2 = siRNA n° 1 à 150 pmol par puits ; 3 = siRNA n° 2 à 100 pmol par puits ; 4 = siRNA n° 2 à 150 pmol par puits ; 5 = siRNA n° 3 à 100 pmol par puits ; 6 = siRNA n° 3 à 150 pmol par puits ; 7 = ctl^+ ; 8 = ctl^-

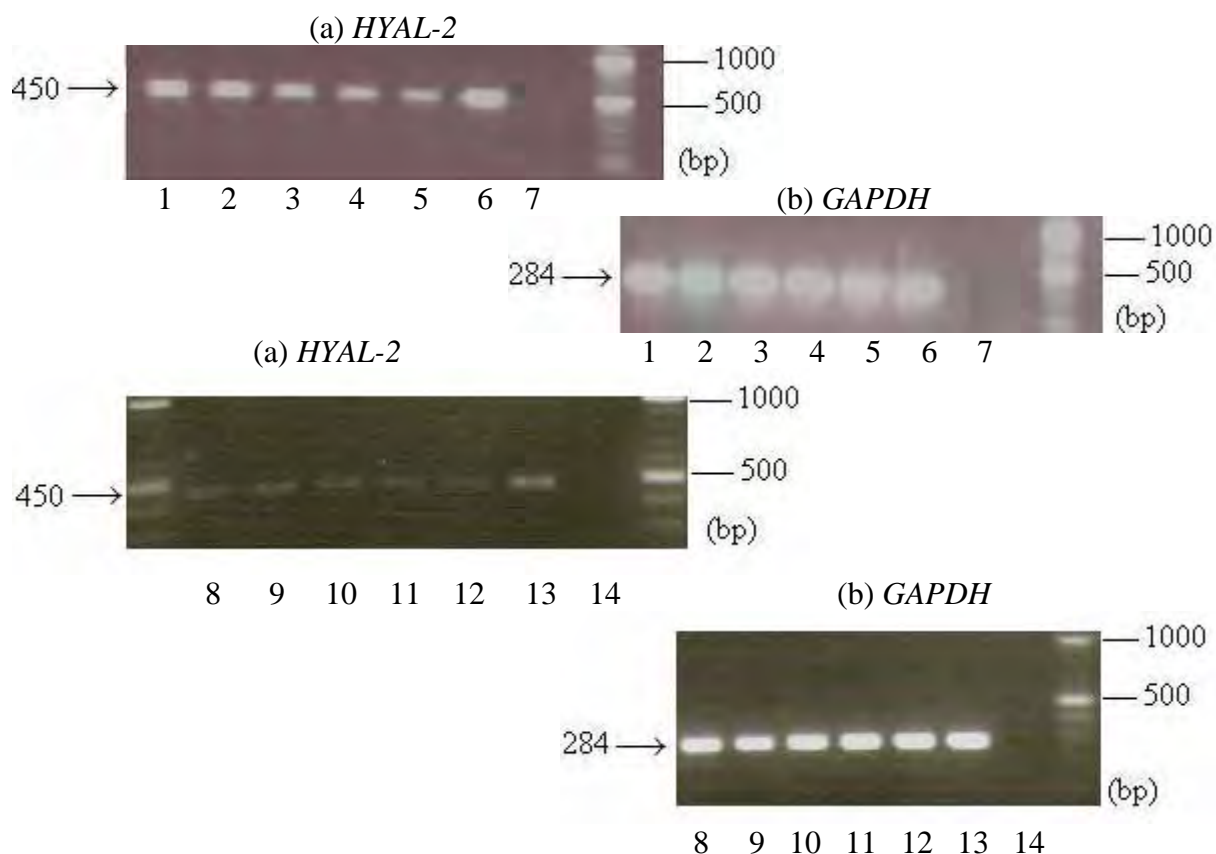


Figure 4.10 : RT-PCR réalisée sur l'ARN extrait 48 heures après transfection de HCT-15 avec différentes quantités de siRNA n° 2 et différentes quantités de Lipofectamine 2000 ou extrait de HCT-15 non transfectées.
 1 = 3 μ l Lipofectamine par puits ; 2 = 4 μ l Lipofectamine par puits ; 3 = 5 μ l Lipofectamine par puits ; 4 = 6 μ l Lipofectamine par puits ; 5 = 7 μ l Lipofectamine par puits ; 6 = ctl^+ ; 7 = ctl^- ; 8 = siRNA 50 pmol par puits ; 9 = siRNA 100 pmol par puits ; 10 = siRNA 150 pmol par puits ; 11 = siRNA 200 pmol par puits ; 12 = siRNA 250 pmol ; 13 = ctl^+ ; 14 = ctl^-

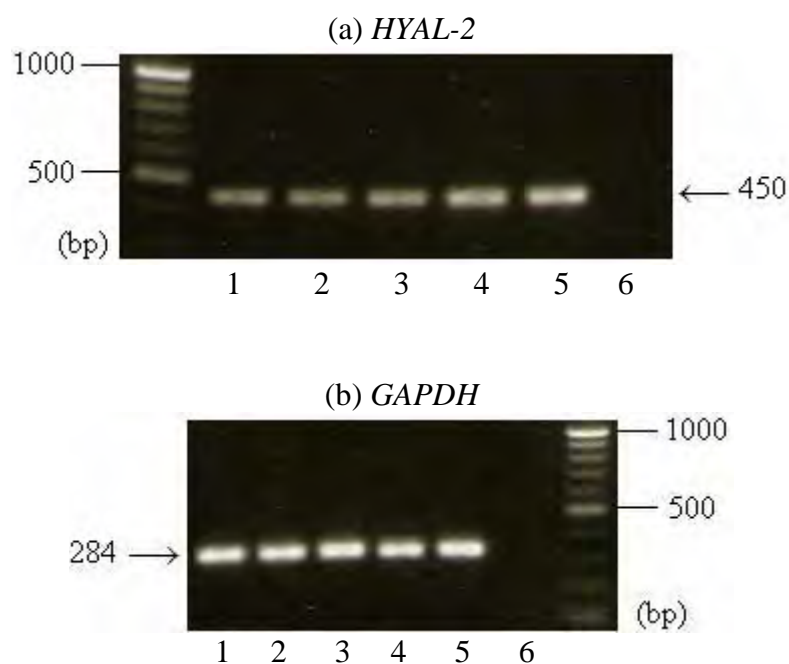


Figure 4.11 : RT-PCR réalisée sur l'ARN extrait 48 heures après la transfection de HCT-15 avec chaque siRNA ou extrait de HCT-15 non transfectées.

1 = siRNA n° 1 ; 2 = siRNA n° 2 ; 3 = siRNA n° 3 ; 4 = ctl⁺ ; 5 = ctl⁺ ; 6 = ctl⁻

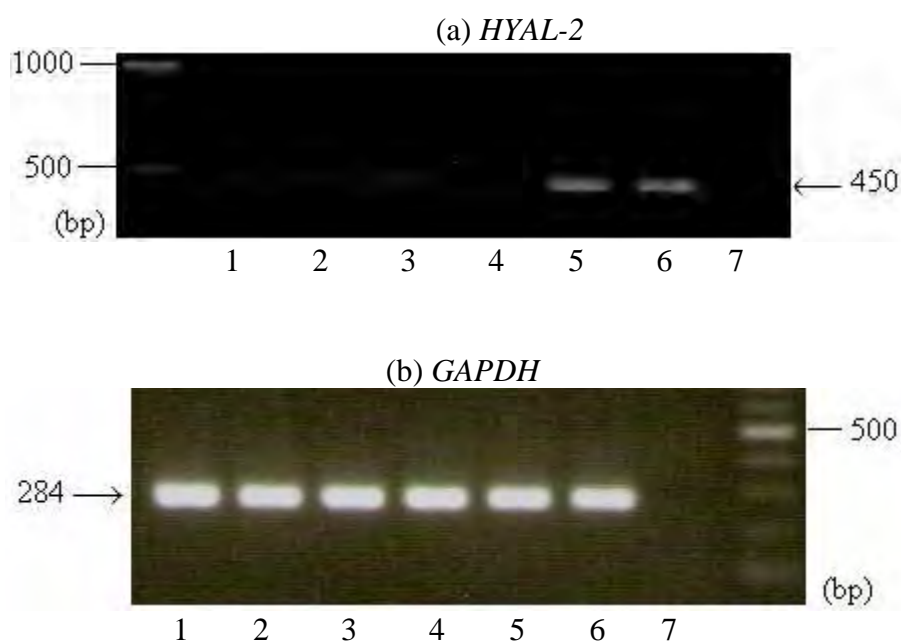


Figure 4.12 : RT-PCR réalisée sur l'ARN extrait 48 heures après transfection de HCT-15 avec différents pools de siRNA ou extrait de HCT-15 non transfectées.

1 = siRNA n°1 et n° 2 ; 2 = siRNA n° 2 et n° 3 ; 3 = siRNA n° 1 et n° 3 ; 4 = siRNA n° 1, n° 2 et n° 3 ; 5 = ctl⁺ ; 6 = ctl⁺ ; 7 = ctl⁻

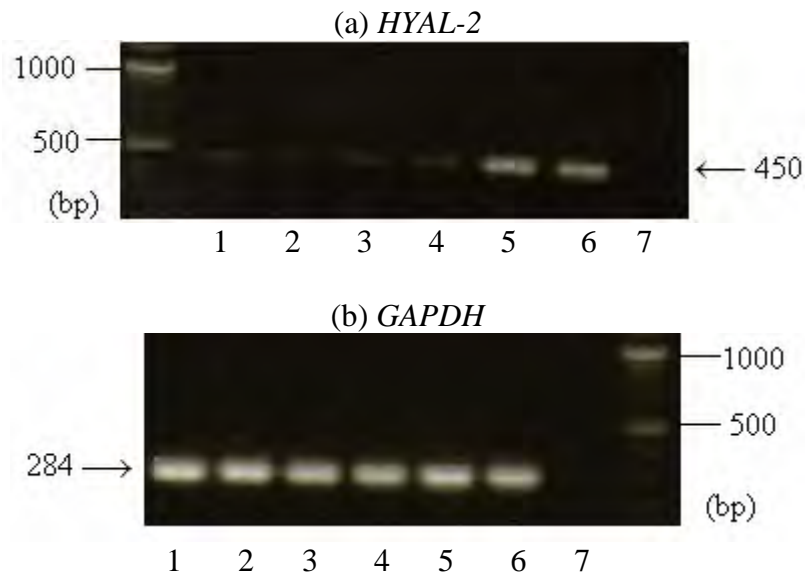


Figure 4.14 : RT-PCR réalisée 48 heures après la transfection de HCT-15, soit avec différentes combinaisons de siRNA, soit avec le scramble.
 1 = siRNA n° 1 et n° 2 ; 2 = siRNA n° 2 et n° 3 ; 3 = siRNA n° 1 et n° 3 ; 4 = siRNA n° 1, n° 2 et n° 3 ; 5 = ctl⁺ ; 6 = ctl⁺ ; 7 = ctl⁻

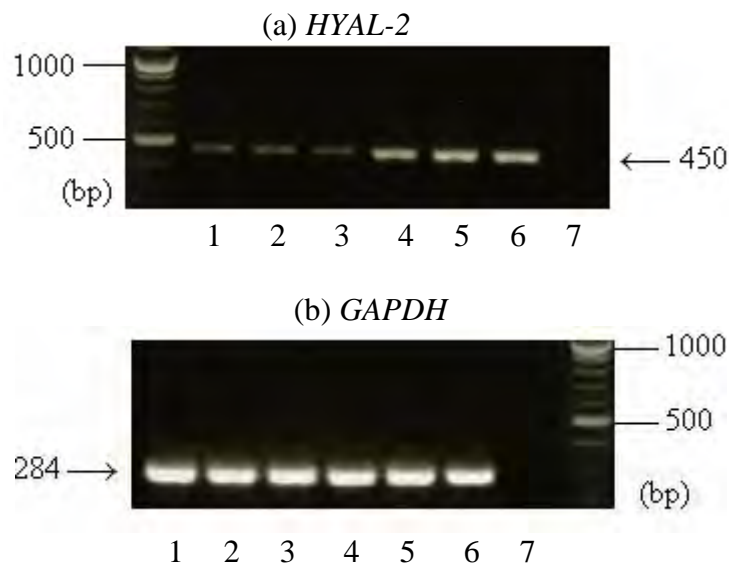


Figure 4.15 : RT-PCR réalisée sur l'ARN extrait à trois temps différents après la transfection de HCT-15 soit avec le pool de siRNA soit avec le scramble.
 1 = siRNA 24 heures ; 2 = siRNA 48 heures ; 3 = siRNA 72 heures ; 4 = ctl⁺ 24 heures ; 5 = ctl⁺ 48 heures ; 6 = ctl⁺ 72 heures ; 7 = ctl⁻

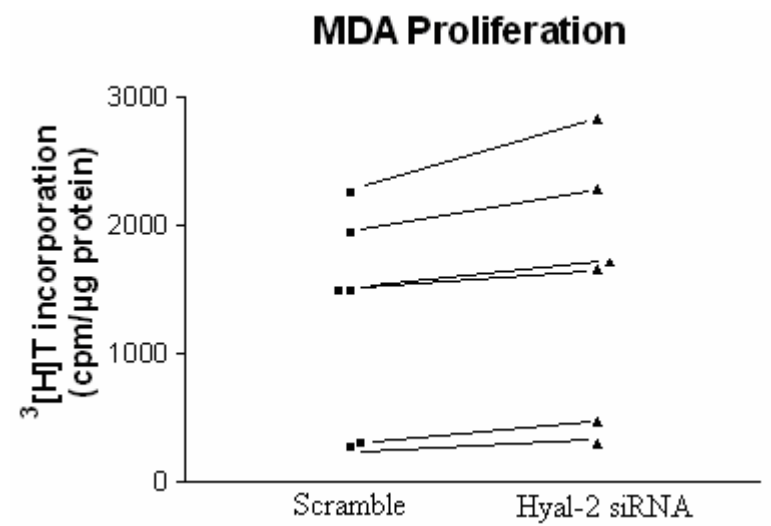


Figure 4.16 : Représentation graphique de la prolifération cellulaire des MDA-MB231 en présence de siRNA dirigés contre *HYAL-2* ou de scramble. Les moyennes obtenues pour chaque expérience pairée sont indiquées.

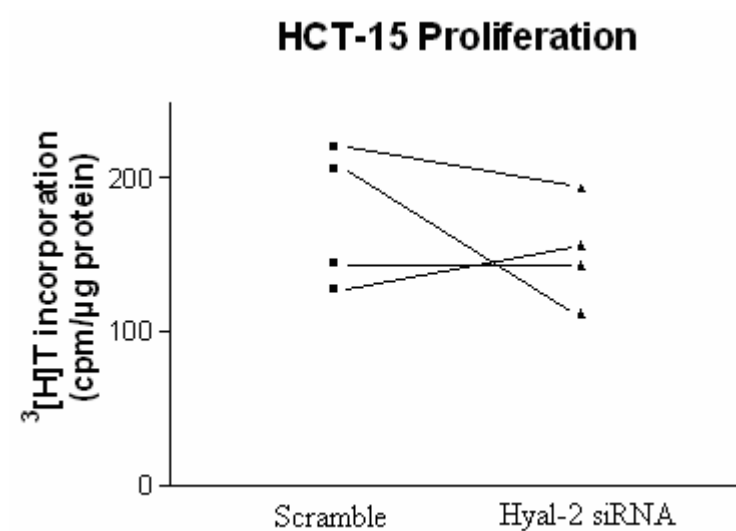
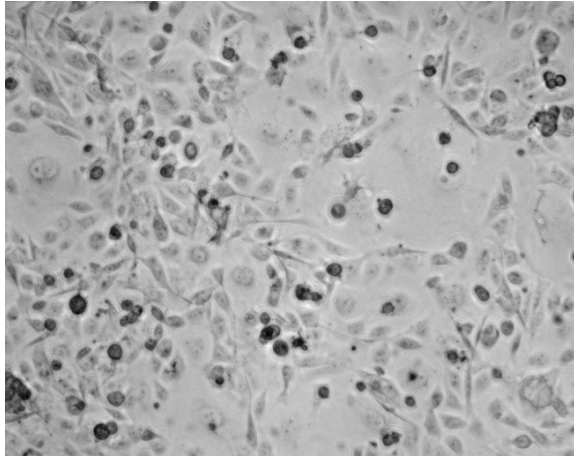
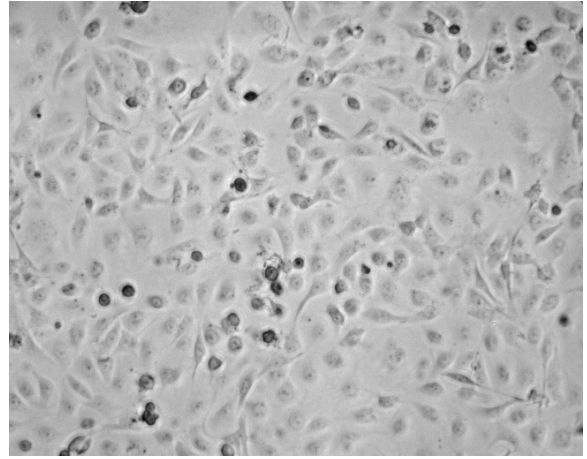


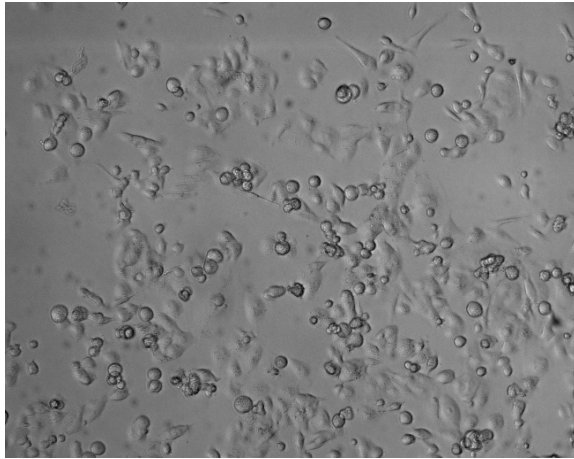
Figure 4.17 : Représentation graphique de la prolifération cellulaire des HCT-15 en présence de siRNA dirigés contre *HYAL-2* ou de scramble. Les moyennes obtenues pour chaque expérience pairée sont indiquées.



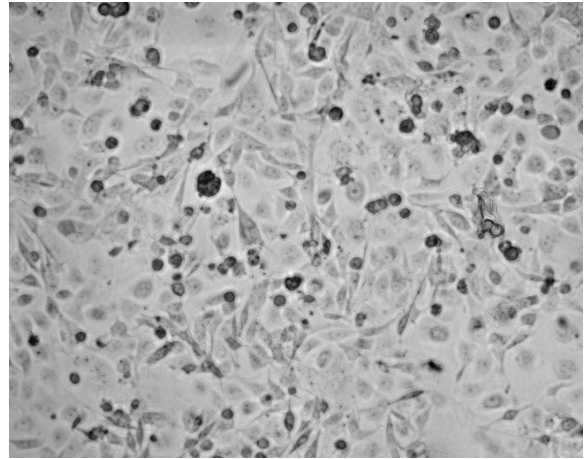
Etoposide 50 μM



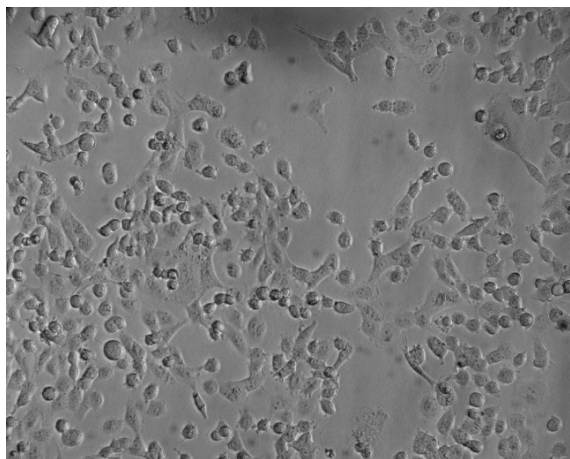
Cisplatin 20 μM



Paclitaxel 5 nM



Doxorubicin 10 μM



CTL

Figure 4.18 : Examen de la morphologie des cellules suite à leur traitement avec différentes concentrations de doxorubicine pendant 20 heures.

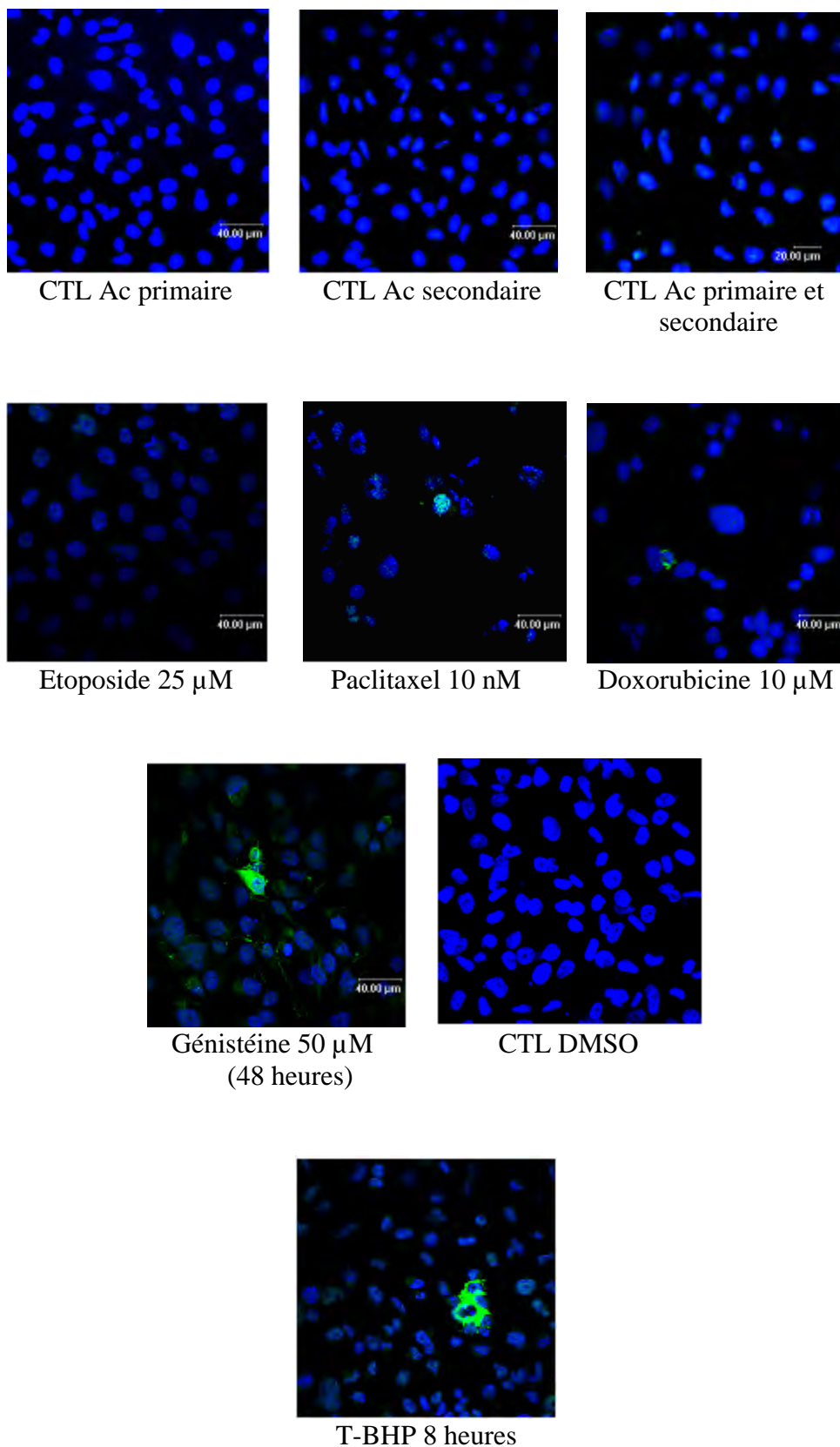


Figure 4.19 : Détection, au moyen d'un anticorps anti-caspase-3 active, de l'apoptose induite dans les MDA-MB231 par différents agents.

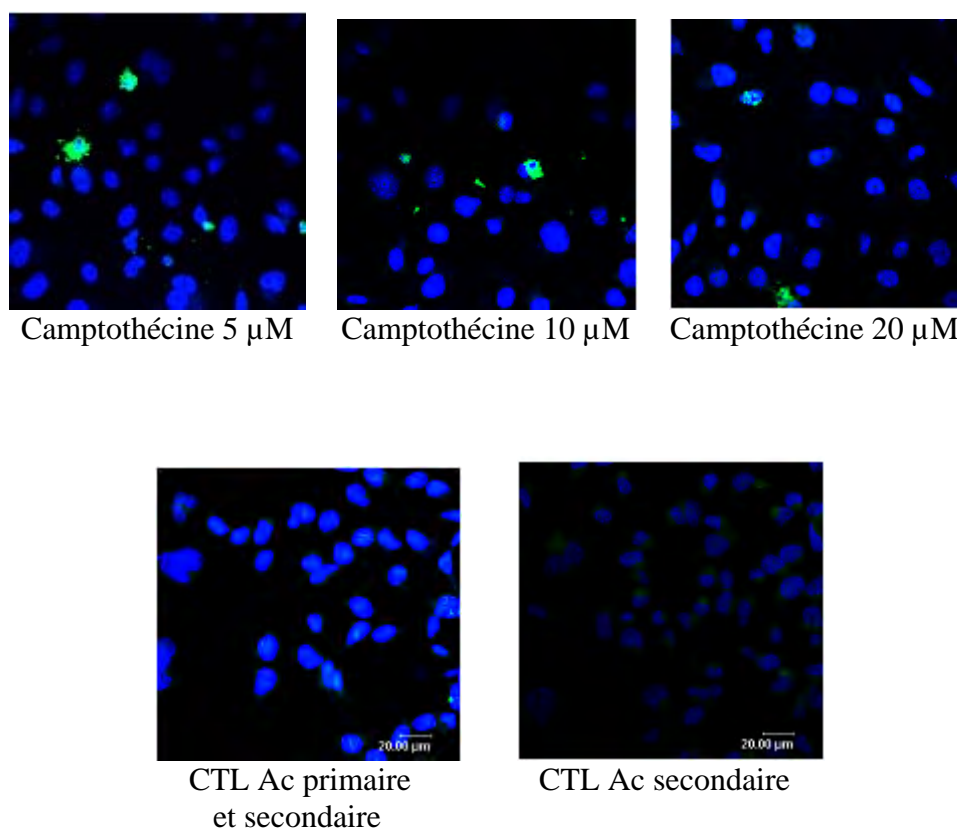


Figure 4.20 : Détection, au moyen d'un anticorps anti-caspase-3 active, de l'apoptose induite dans les MDA-MB231 par 3 concentrations différentes de camptothécine pendant 20 heures.

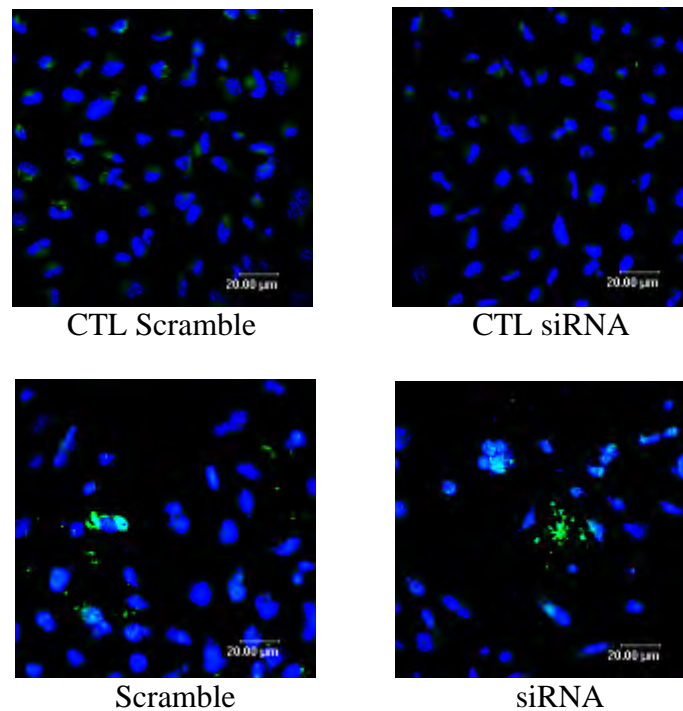


Figure 4.21 : Détection, au moyen d'un anticorps anti-caspase-3 active, de l'apoptose suite à la transfection par les siRNA dirigés contre *HYAL-2* ou par le scramble, de MDA-MB231 ensemencées à 250.000 cellules. Les cellules contrôles ont été mises en présence de l'anticorps secondaire sans anticorps primaire.

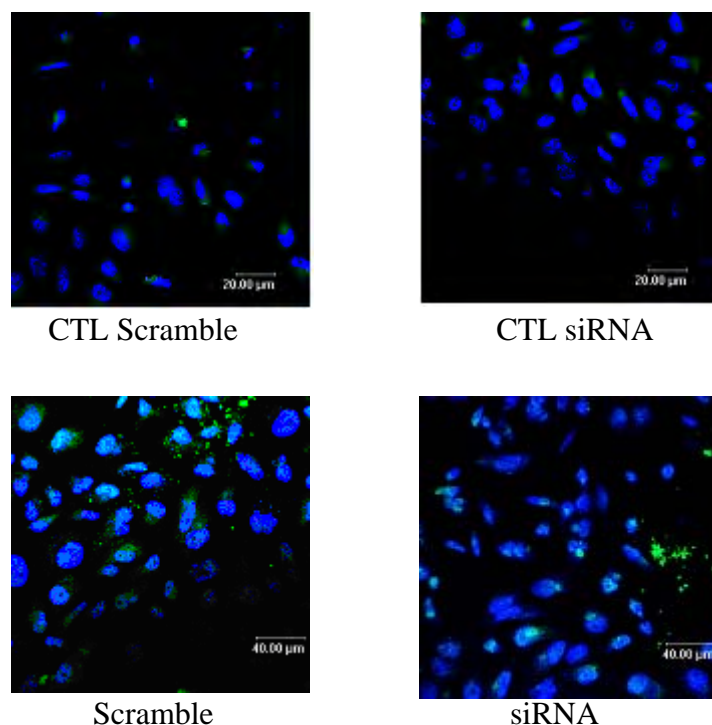
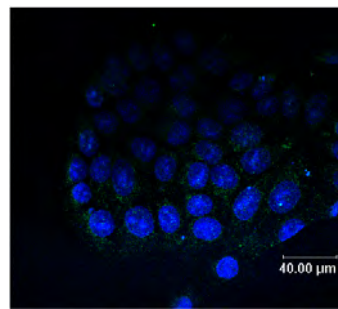
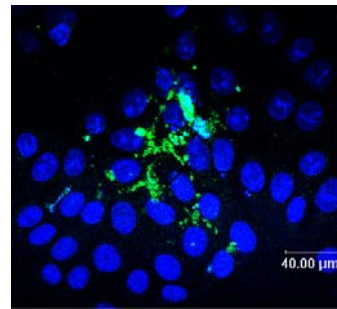


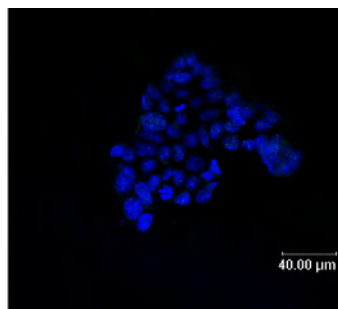
Figure 4.22 : Détection, au moyen d'un anticorps anti-caspase-3 active, de l'apoptose induite dans les MDA-MB231 par 5 μ M de camptothécine pendant 20 heures après transfection par les siRNA dirigés contre *HYAL-2* ou par le scramble. Les cellules contrôles ont été mises en présence d'anticorps secondaire sans anticorps primaire.



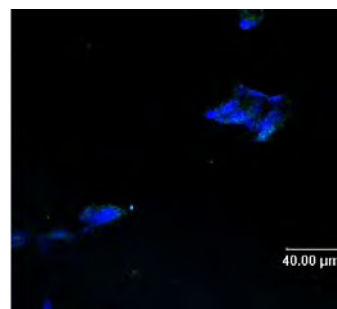
Doxorubiciné 0,5 μ M



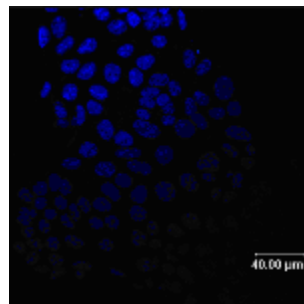
Doxorubicine 1 μ M



Paclitaxel 50 nM

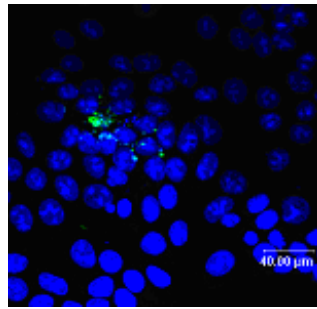


Paclitaxel 100nM

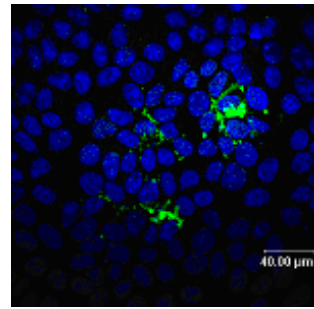


Contrôle

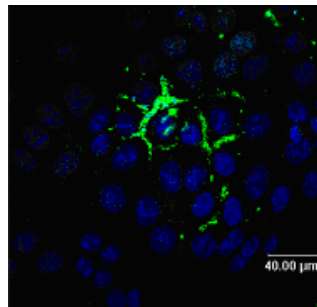
Figure 4.23 : Induction de l'apoptose dans les HCT-15 par deux agents différents à deux concentrations différentes. L'apoptose est détectée au moyen d'un anticorps anti-caspase-3 active.



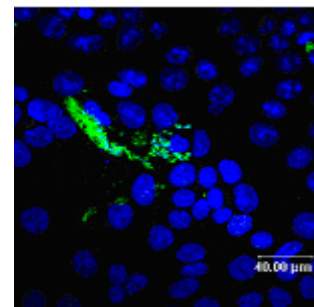
doxorubicine 0,5 μ M



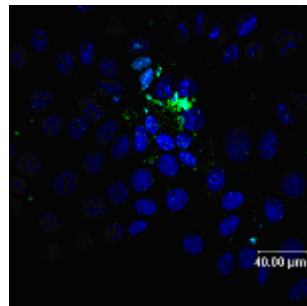
doxorubicine 0,75 μ M



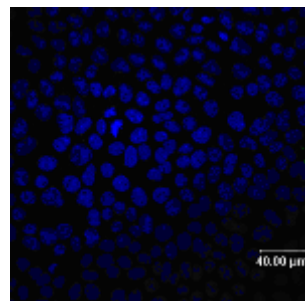
doxorubicine 1 μ M



doxorubicine 1,25 μ M



doxorubicine 1,5 μ M



contrôle

Figure 4.24 : Induction de l'apoptose dans les HCT-15 par différentes concentrations de doxorubicine. L'apoptose est détectée au moyen d'un anticorps anti-caspase-3 active.

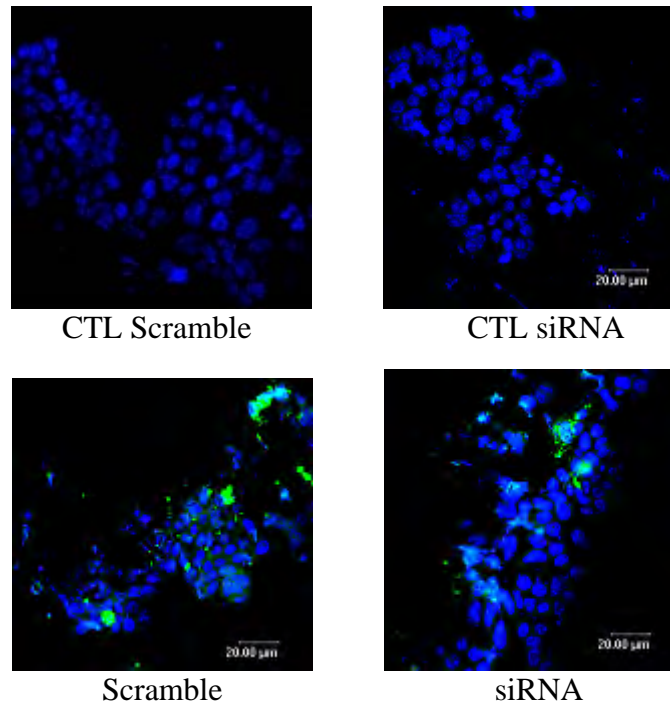


Figure 4.25 : Etude de l'induction de l'apoptose suite à la transfection par les siRNA dirigés contre *HYAL-2* ou par le scramble de HCT-15ensemencées à 250.000 cellules. L'apoptose est détectée au moyen d'un anticorps anti-caspase-3 active. Les cellules contrôles ont été mises en présence de l'anticorps secondaire sans anticorps primaire.

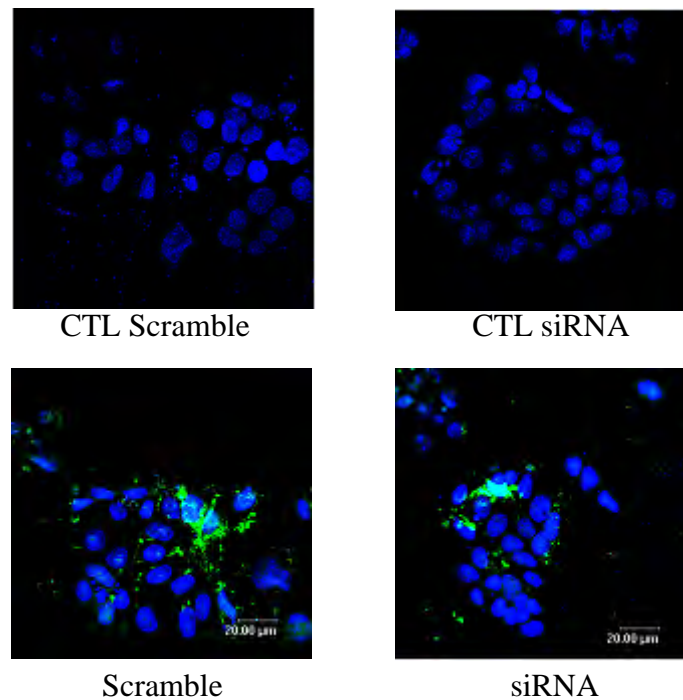


Figure 4.26 : Etude de l'induction de l'apoptose, par 1 μ M de doxorubicine pendant 20 heures, dans les HCT-15ensemencées à 250.000 cellules par puits et transfectées par le pool de siRNA dirigés contre *HYAL-2* ou par le scramble. L'apoptose est détectée au moyen d'un anticorps anti-caspase-3 activée. Les cellules contrôles ont été mises en présence de l'anticorps secondaire sans anticorps primaire.

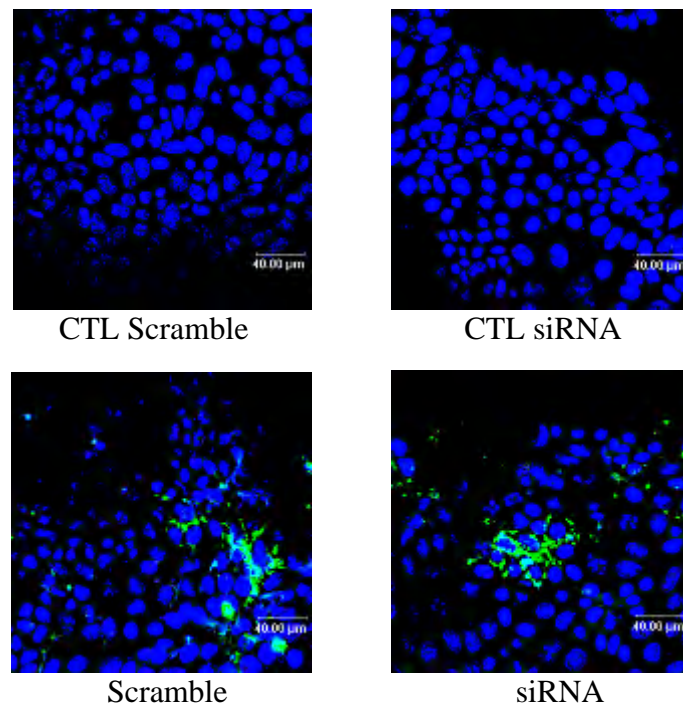


Figure 4.27 : Etude de l'induction d'apoptose suite à la transfection de HCT-15 avec le pool de siRNA ou avec le scramble. L'apoptose est détectée au moyen d'un anticorps anti-caspase-3 activée. Les cellules contrôles ont été mises en présence de l'anticorps secondaire sans anticorps primaire.

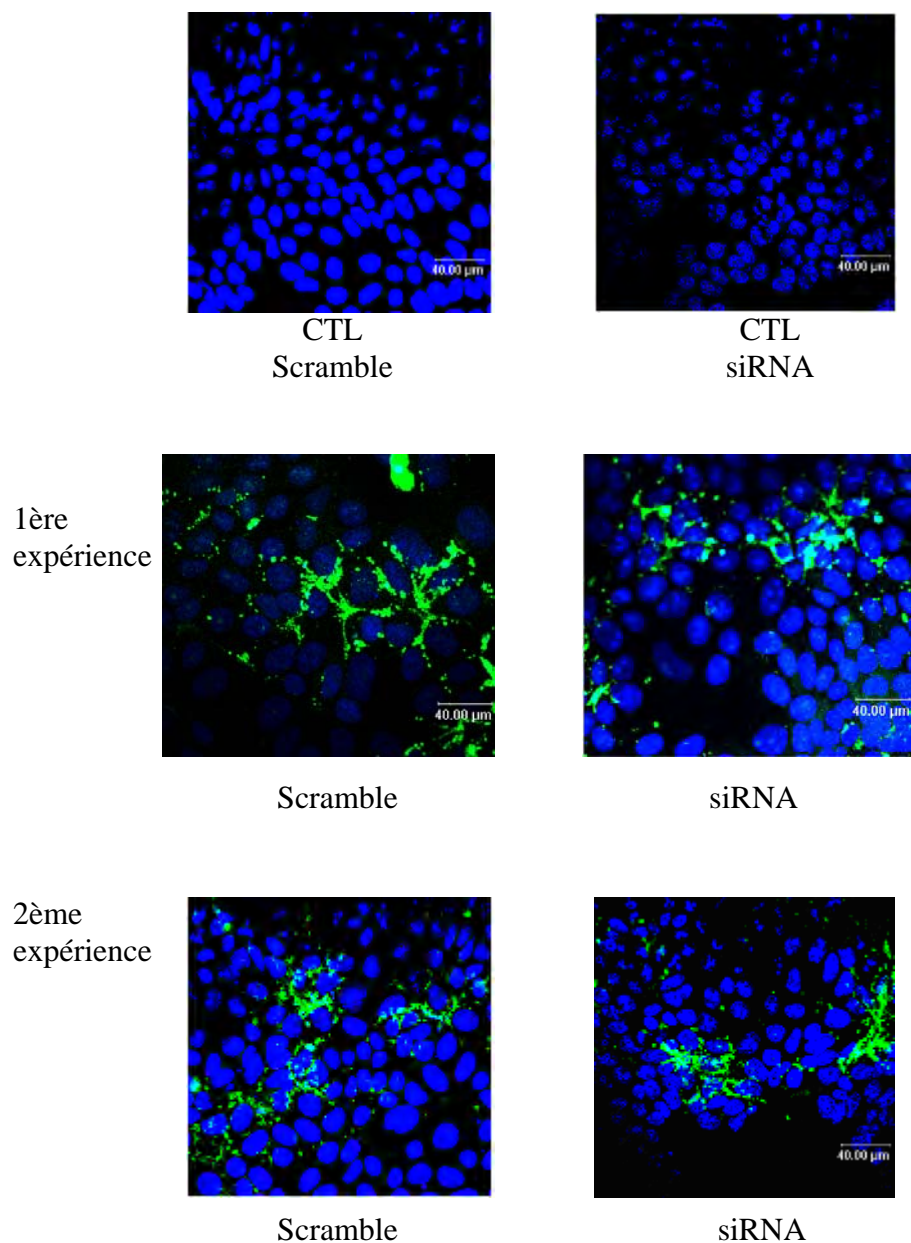


Figure 4.28 : Etude de l'induction de l'apoptose, par 1 μ M de doxorubicine pendant 20 heures, dans les HCT-15ensemencées à 500.000 cellules par puits et transfectées par le pool de siRNA dirigés contre *HYAL-2* ou par le scramble. L'apoptose est détectée au moyen d'un anticorps anti-caspase-3 activée. Les cellules contrôles ont été mises en présence de l'anticorps secondaire sans anticorps primaire.

	Scramble	siRNA
250.000 cellules	0,199	0,213
500.000 cellules 1 ^{ère} expérience	0,165	0,100
500.000 cellules 2 ^{ème} expérience	0,093	0,079

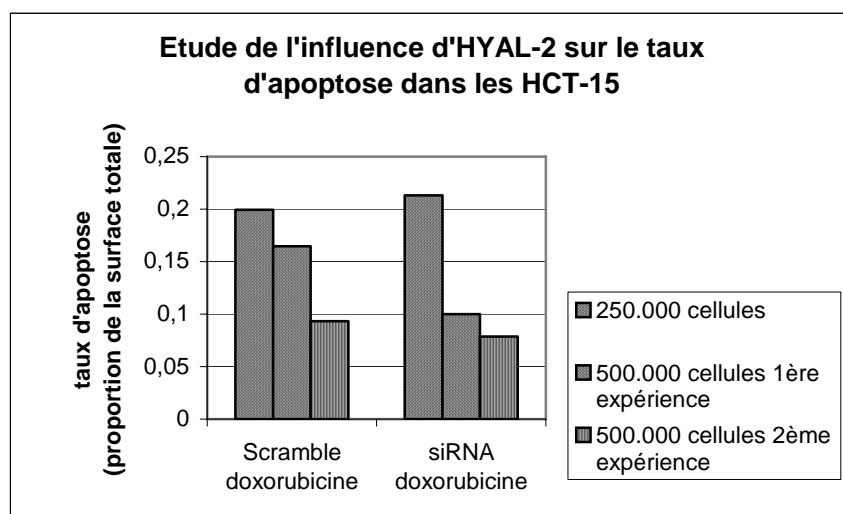


Tableau 4.2 et Figure 4.29: Etude du taux d'apoptose dans les HCT-15 ensemencées à raison de 250.000 ou de 500.000 cellules par puits, transfectées avec les siRNA dirigés contre *HYAL-2* ou avec le scramble et traitées pendant 20 heures avec 1 μ M de doxorubicine. Le taux d'apoptose a été mesuré par l'immunohistochimie anti-caspase 3 active, grâce au logiciel Scion Image. Les valeurs représentent la proportion de surface positive pour la caspase 3 active par rapport à la surface totale. Chaque particule est une zone subcellulaire présentant un taux de caspase-3 active dépassant un seuil déterminé. Les moyennes sont indiquées dans le tableau et représentées graphiquement.

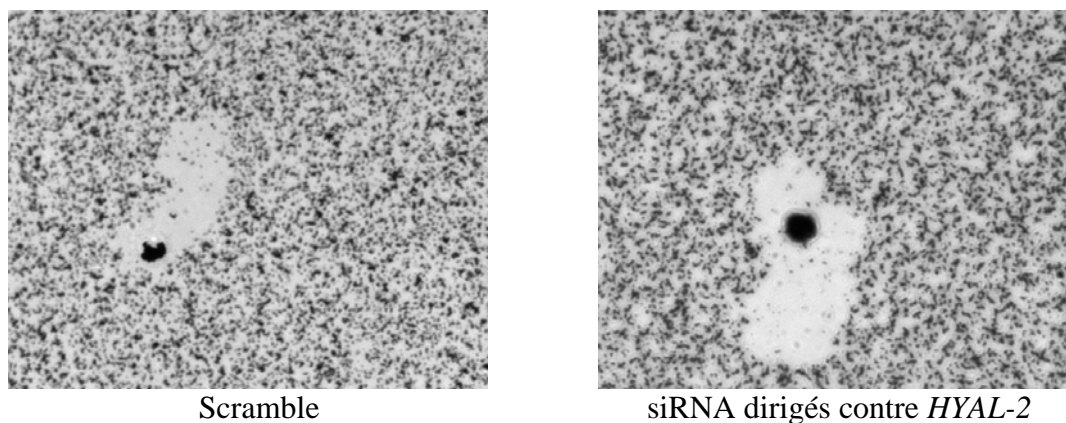


Figure 4.30 : Etude au microscope à contraste de phase de la motilité des MDA-MB231 suite à leur transfection avec les siRNA dirigés contre *HYAL-2* ou avec le scramble. Les cellules ont migré pendant 18 heures. La surface parcourue par les cellules est dépourvue de particules d'or et a été mesurée grâce au logiciel Scion.

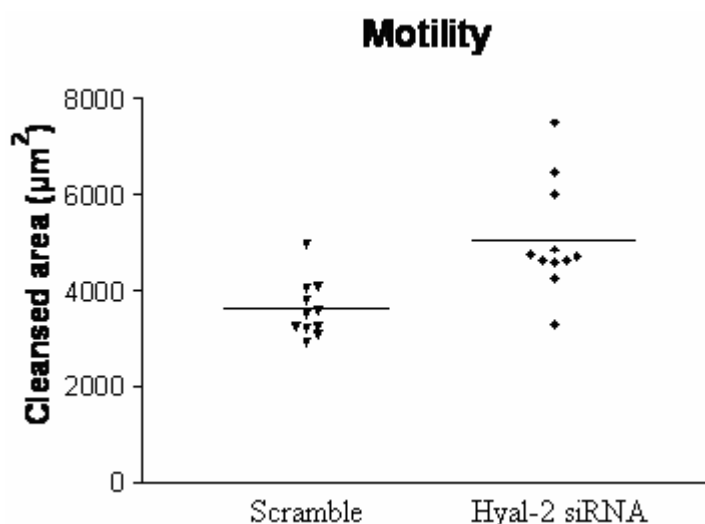


Figure 4.31 : Représentation graphique des moyennes des surfaces parcourues par les cellules observées sur chaque lamelle. La moyenne des différentes expériences effectuées sur les cellules transfectées soit avec les siRNA dirigés contre *HYAL-2* soit avec le scramble est indiquée par une ligne horizontale.

	Scramble	siRNA
Moyenne \pm SEM (μm^2)	3624 \pm 176,5	5071 \pm 350,7
Gain de motilité relative pour les cellules transfectées avec les siRNA	+39,9 %	
Intervalle de confiance à 95 %	+17,3 à +62,5 %	

Tableau 4.3 : Résultats de l'analyse statistique de la motilité des MBA-MB231.